

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immunaktivierung von myeloiden Suppressorzellen durch Toll-like-Rezeptor-Liganden wird
über akzessorische Zellen vermittelt**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von Georg Wedekind
aus Tett nang
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Marion Subklewe Prof. Dr. med. Tobias Feuchtinger
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin Dr. rer. nat. Christine Zoglmeier
Dekan:	Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	18.05.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen und Normen.....	7
1.1	Abkürzungen und Definitionen.....	7
1.2	Verwendete Zellpiktogramme	8
2	Einleitung.....	9
2.1	Die Entstehung des Immunsystems.....	9
2.2	Einteilung des Immunsystems.....	10
2.2.1	Das angeborene Immunsystem	10
2.2.2	Das erworbene Immunsystem.....	12
2.3	Regulatorische Komponenten des Immunsystems.....	12
2.3.1	Inhibitorische Zellen des Immunsystems.....	12
2.3.2	Myeloide Suppressorzellen als inhibitorische Komponente des Immunsystems	13
2.4	Die Rolle des Immunsystems bei der Onkogenese und Tumorprogression.....	13
2.5	MDSCs bei inflammatorischen Erkrankungen.....	14
2.6	Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen durch Immunmodulation	14
2.7	Fragestellung und Ziel.....	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Material	17
3.1.1	Kulturmedien	17
3.1.2	Reagenzien.....	18
3.1.2.1	Chemikalien.....	18
3.1.2.2	Puffer und Lösungen.....	18
3.1.2.3	Biomoleküle und -verbindungen	20
3.1.3	Versuchstiere	21
3.1.3.1	Das SV40-Modell	21
3.1.4	Verwendete Geräte und Software.....	22
3.1.4.1	Geräte.....	22
3.1.4.2	Software.....	23
3.1.5	Sonstiges Material.....	24
3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Tierversuche	24
3.2.1.1	Versuchstierhaltung.....	24
3.2.1.2	Tumorinduktion	24
3.2.1.3	Organentnahme.....	25
3.2.1.4	Adoptiver Zelltransfer	26
3.2.2	Zellbiologische Methoden.....	26
3.2.2.1	Gewinnung der Splenozyten.....	26
3.2.2.2	Isolation der MDSCs	26

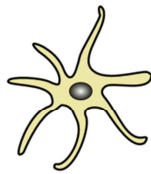
3.2.2.3	T-Zell Aufreinigung	29
3.2.2.4	Zellkultur	30
3.2.2.5	MDSC Hemmversuche durch Kokultivierung	32
3.2.3	Immunologische Methoden.....	32
3.2.3.1	FACS.....	32
3.2.3.2	ELISA	39
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.4.1	RT-PCR.....	40
3.2.4.2	BrdU-Wachstumsassay	45
3.2.5	Statistische Methoden	47
4	Ergebnisse	49
4.1	MDSCs im SV40-Modell und in korrespondierenden Tumormodellen	49
4.1.1	Expansion der MDSCs.....	49
4.1.2	Inhibitorischer Effekt der MDSCs	51
4.1.2.1	Effekt auf die Proliferation durch MACS-gesortete MDSCs	52
	54
4.1.2.2	Hemmung der IL-2-Produktion durch MDSCs	54
4.2	Überleben der MDSCs in Zellkultur	56
4.3	Funktioneller Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf MDSCs.....	58
4.4	Reaktive Sauerstoffspezies in MDSCs.....	61
	Diskussion.....	66
	Zusammenfassung.....	75
5	Danksagung.....	77
6	Veröffentlichungen	79
	Lebenslauf.....	81
7	Literaturverzeichnis	83
8	Abbildungsverzeichnis.....	87

1 Abkürzungen und Normen

1.1 Abkürzungen und Definitionen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BP	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
CEA-Promoter	Promoter des carcinoembryonalen Antigens
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FCS HI	Hitzeinaktiviertes FCS
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GvHD	Graft versus host disease
HI	Hitzeinaktiviert
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
Ly6	Lymphozyten Antigengruppe 6
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MO-MDSC	Mononukleäre MDSC
NEAA	Non-essential amino acids
PBS	Phosphate-buffered saline
PMN-MDSC	Polymorphnukleäre MDSC
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>Roswell-Park-Memorial-Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SC	Splenozyten
SDHA	Succinatdehydrogenase A
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TZM	T-Zell-Medium
WT	Wildtyp

1.2 Verwendete Zellpiktogramme



DC



PMN-MDSC



MO-MDSC



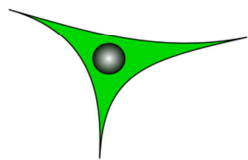
B-Lymphozyt



T-Lymphozyt



Erythrozyt



Retikulumzelle



Zellschrott

Abbildung 1: Zellpiktogramme

2 Einleitung

2.1 Die Entstehung des Immunsystems

Die ureigene Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung von „Fremd“ und „Selbst“. Diese Notwendigkeit kam phylogenetisch mit der Entstehung von invasiven Arten, wie z. B. Bakterien, die mehrzellige Lebewesen angreifen. Selbst einfache Bakterien sehen sich mit der Aufgabe konfrontiert „Fremd“, wie beispielsweise Phagen, zu erkennen und abzuwehren. Es stehen hier zum Beispiel Abwehrmechanismen zu Verfügung, die über das Vorhandensein oder Fehlen von DNA-Modifikationen Fremd-DNA erkennen und mit Hilfe von Restriktionsenzymen diese dann hydrolysieren (BICKLE & KRÜGER, 1993). Viele Archaeen und Bakterien besitzen zudem ein sogenanntes *CRISPR-Cas-System* (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), das vermutlich Phagengenome erkennt und gegen fremde Nukleinsäuren eine Immunantwort aufbaut (BARRANGOU *ET AL.*, 2007). Mit der Entwicklung von mehrzelligen Lebewesen wurde die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“ deutlich komplexer, da ein Immunsystem in einem Zellverbund mehrere verschiedene eigene Zelltypen von Invasoren unterscheiden muss. In höheren Lebewesen wird das Immunsystem in zwei Bereiche unterteilt: ein adaptives und ein angeborenes Immunsystem. Molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das adaptive aus dem angeborenen Immunsystem entwickelt hat. Somit ist das adaptive Immunsystem jünger als das angeborene. Den phylogenetisch ältesten Bereich des Immunsystems stellen antimikrobielle Peptide wie die Defensine dar. Diese findet man sowohl in der Pflanzen- als auch in der Tierwelt (THOMMA *ET AL.* 2002, SCHNEIDER *ET AL.* 2005). Sie stehen zur Abwehr von Bakterien und Pilzen zur Verfügung. Bestandteile des Komplementsystems findet man bereits in phylogenetisch alten Lebewesen wie Seeigeln (SMITH *ET AL.* 2001). Es hat sich wahrscheinlich in wirbellosen Tieren entwickelt. Allerdings ist der klassische Weg des Komplementsystems mit der Aktivierung über Antikörper wesentlich jünger. Diesen findet man erst ab der Evolutionsstufe der Knorpelfische (CLEM *ET AL.* 1967). Der älteste bisher bekannte antigenspezifische Teil des Immunsystems in eukaryotischen Lebewesen ist das TLR-System. In der Fruchtfliege *Drosophila* wurden *Toll-like*-Rezeptoren als essentiell für die Abwehr von Pilzinfektionen identifiziert (LEMAITRE *ET AL.* 1996). In weiteren Untersuchungen fanden sich verwandte Systeme auch in Pflanzen (MCHALE *ET AL.* 2006).

Das adaptive Immunsystem entwickelte sich erst später. Nach heutigem Wissensstand tritt es erst ab der Klasse der Knorpelfische auf. Als ein Vertreter dieser Klasse seien die Haie genannt. Diese besitzen bereits zwei Antikörperklassen. Bereits diese Antikörper erlangen ihre Diversität mit somatischer Hypermutation und V(D)J- Kassetten-Rearrangement, wie man es von den Säugetieren

kennt (ZHU ETAL. 2012). Dieser für das adaptive Immunsystem essentielle Mechanismus fehlt sämtlichen Knorpelfischvorläufern. Das Immunsystem stellt somit ein komplexes mehrteiliges System der Abwehr dar, das sich phylogenetisch in mehreren Etappen entwickelt hat. Das hohe phylogenetische Alter ist ein Hinweis auf seine essentielle Bedeutung.

2.2 Einteilung des Immunsystems

2.2.1 Das angeborene Immunsystem

Eine wesentliche Eigenschaft des angeborenen Immunsystems besteht darin, dass die Zielstrukturen vordefiniert sind und nicht geändert werden können. Es besteht aus löslichen humoralen und zellulären Komponenten. Zu den humoralen Komponenten zählen die Defensine und das Komplementsystem. Beide sind gegen konservierte Eigenschaften von Erregern gerichtet. Das Komplementsystem besitzt mehrere Wege: Einen klassischen Weg, in dem das Komplementsystem über Antikörper mit dem spezifischen Immunsystem interagiert, und einen alternativen Weg über spontane Aktivierung an Pathogenoberflächen und den Lektin-Weg. Hier wird das Komplementsystem über bakterielle Peptidoglykane aktiviert. Defensine interagieren dahingegen mit cholesterinarmen Membranen. Beide – Komplement-Proteine und Defensine – zeichnen sich dadurch aus, dass sie Zielstrukturen auf Pathogenen erkennen, die von Erregern kaum variiert werden können. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen die Zellen des mononukleären Phagozytosesystems sowie natürliche Killerzellen. Eine wichtige Rezeptorfamilie des angeborenen Immunsystems (die sich allerdings auch auf Zellen des spezifischen Immunsystems findet) stellen die *Toll-like*-Rezeptoren dar. Sie binden an spezifische Strukturen oder Komponenten von Pathogenen. Das angeborene Immunsystem ist zwar auf starre Zielstrukturen festgelegt, hat aber den Vorteil, dass es nicht erst an ein Fremdantigen angepasst werden muss. Damit steht es zum einem von Geburt an zur Verfügung. Zum anderen kann es viel schneller auf eine Bedrohung reagieren als ein System, das sich erst an die Zielstruktur anpassen muss. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der *Toll-like*-Rezeptoren in Säugetieren.

Rezeptor	Zielstruktur	Lokalisation	Literatur
TLR1 (CD281)	Triacyl-Lipopeptid; (<i>Bakterien, Mykobakterien</i>); bildet Dimere mit TLR2	Zellmembran	ROCK <i>ET AL.</i> (1998)
TLR2 (CD282; TIL4)	GPI-Anker (<i>Trypanosomen</i>); Porin (<i>Neisseria</i>); Lipomannan (<i>Mykobakterien</i>); Peptidoglykan (<i>Gram-positive Bakterien</i>); Phospholipomannan (<i>Candida</i>); Hämagglutinin (<i>Masern Virus</i>)	Zellmembran	ROCK <i>ET AL.</i> (1998)
TLR3 (CD283)	dsRNA; polyI:C; (<i>Viren</i>)	Endosom	ROCK <i>ET AL.</i> (1998)
TLR4 (CD284; ARMD-10)	Lipopolysaccharid (<i>Bakterien</i>); Mannan (<i>Candida</i>); Glycoinositolphospholipide (<i>Trypanosomen</i>); virale Hüllproteine; HSP 60, HSP 70 und Fibrinogen (<i>Wirtstrukturen</i>)	Zellmembran	ROCK <i>ET AL.</i> (1998)
TLR5 (CD285; TIL3)	Lipoarabinomannan (<i>Mykobakterien</i>)	Zellmembran	ROCK <i>ET AL.</i> (1998)
TLR6 (CD286)	Diacyl-Lipopeptid (<i>Mykoplasmen</i>); Zymosan (<i>Pilze</i>); bildet Dimere mit TLR2	Zellmembran	OZINSKY <i>ET AL.</i> (2000)
TLR7 (CD287)	ssRNA (<i>Viren</i>)	Endosom	DU <i>ET AL.</i> (2000)
TLR8 (CD288)	ssRNA (<i>Viren</i>)		DU <i>ET AL.</i> (2000)
TLR9 (CD289)	Nicht-methylierte CpG-Motive; (<i>Bakterien und Viren</i>)	Endosom	DU <i>ET AL.</i> (2000)
TLR10 (CD290)	Nicht bekannt	Nicht bekannt	CHUANG & ULEVITCH (2001)
TLR11	Uropathogene Bakterien; Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Endosom	ZHANG <i>ET AL.</i> (2004)
TLR12	Nicht bekannt	Nicht bekannt	MISHRA <i>ET AL.</i> (2008)
TLR13	23S rRNA, (<i>Bakterien und Viren</i>)	Nicht bekannt	SHI <i>ET AL.</i> (2011), OLDENBURG <i>ET AL.</i> (2012)

Tabelle 1: Überblick über die bislang bekannten Toll-like-Rezeptoren in Säugetieren

2.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem stellt eine Erweiterung des angeborenen Immunsystems dar. Über die Bildung von zellulären oder humoralen (Antikörpern) Komponenten, die sich spezifisch gegen Antigene richten, ist es in der Lage, eine Vielzahl von Erregern zu identifizieren und anzugreifen. Dabei sind angeborenes und erworbenes Immunsystem verzahnt. Antikörper binden zum Beispiel beim klassischen Weg an das Komplementsystem und aktivieren so das angeborene Immunsystem. Umgekehrt wirken die Komponenten des Komplementsystems als Aktivatoren von antigenpräsentierenden Zellen.

2.3 Regulatorische Komponenten des Immunsystems

Eine unabdingbare Voraussetzung für ein funktionierendes Immunsystem ist dessen Regulation. Dabei sind sowohl aktivierende als auch hemmende Komponenten von Nöten um eine effektive Regulation sicher zu stellen. Dieses Regulativ ist erforderlich, um eine adäquate Immunantwort auf einen Entzündungsreiz auszulösen. Des Weiteren ist es unabdingbar, diesen Prozess sowohl zeitlich als auch örtlich zu begrenzen. Geschieht dies nicht, kommt es zu einer, schwer oder gar tödlich verlaufenden, Entzündungsreaktion. Selbst gering ausgeprägte Entzündungen sind von klinischer Relevanz. So bilden z. B. chronische Entzündungen im gastroösophagealen Übergang ein erhöhtes Krebsrisiko. Diese Balance in Richtung Entzündungsaktivierung zu verschieben, aber trotzdem im therapeutischen Rahmen zu bleiben, ist das Ziel sowie die Herausforderung einer immunmodulatorischen Therapie in der Tumorthherapie.

2.3.1 Inhibitorische Zellen des Immunsystems

Das Immunsystem beinhaltet nicht nur aktivierende Komponenten, sondern auch inhibitorische Elemente. Als Beispiel seien hier regulatorische T-Zellen genannt. Dies sind CD4 CD25 positive Zellen, die FOXP3 exprimieren (HORI *ET AL.* 2003). Sie entfalten ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten unter anderem über Zytokine wie IL-10, TGF- β oder die Induktion von Apoptose. In den letzten Jahren wurden weitere Zellpopulationen identifiziert, die als inhibitorisch gelten. Hierzu zählen unter anderem die Natürlichen Killer-T-Zellen. Dass regulatorische Komponenten interagieren, wurde beispielsweise bei den T-Regs mit einem anderen inhibitorischen Zelltyp, den „Myeloid-derived suppressor cells“ (MDSCs) diskutiert, die wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle in der Immunmodulation spielen (SERAFINI *ET AL.* (2008)(siehe auch 2.3.2). In der Realität dürften die Übergänge von inhibitorischen zu aktivierenden Komponenten fließend sein. Dies ist bei experimentellen Ansätzen immer zu bedenken. Eine reine Phänotypisierung von inhibitorischen Zellen über Oberflächenmarker alleine ist daher nicht sinnvoll. Hier ist immer ein funktioneller Nachweis der Suppressivität zu erbringen um die Zellpopulation korrekt zu identifizieren.

2.3.2 Myeloide Suppressorzellen als inhibitorische Komponente des Immunsystems

Als „Myeloid-derived suppressor cells“ (MDSCs) wird eine heterogene Population myeloider Zellen bezeichnet, die in der Maus über die Oberflächenantigene Gr1⁺ und CD11b⁺ von anderen Zellpopulationen abgegrenzt werden kann. Gr1 ist ein Antigen der Lymphozyten Antigengruppe 6 (Ly6), wobei der gegen dieses Antigen gerichtete Antikörper mit den Epitopen Ly6C und Ly6G kreuzreagiert. Die Antigene Ly6C und Ly6G teilen die MDSCs in zwei Untergruppen auf: zum einem in die PMN-MDSCs, die eher einen granulozytären Charakter haben und einen Gr1⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} Phänotyp besitzen (YOUN *ET AL.* 2008). Zum anderen in die MO-MDSCs, die eine monozytäre Morphologie besitzen und folgenden Ag-Phänotyp aufweisen: Gr1⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{high}. Der Mensch exprimiert kein analoges Gen zu Gr1. Hier werden MDSCs als Zellen definiert die für CD33 positiv sind, aber keine Maturierungsmarker von myeloiden Zellen wie MHCII HLA-DR exprimieren. Darüber hinaus werden beim Menschen auch CD15⁺ MDSCs im peripheren Blut gefunden. Ein weiteres Charakteristikum der MDSCs ist der sogenannte Differenzierungsblock. Dies bezeichnet das Phänomen, dass bei Tumorerkrankungen die Population der MDSCs expandiert, dabei die Zahl der reifen dendritischen Zellen vermindert ist (CHENG *ET AL.* 2008). Es wird vermutet, dass MDSCs eine Vorstufe dieser Zellen darstellen, die in ihrer Differenzierung gehemmt sind. Daraufhin treten diese als unreife Zellen in der Peripherie auf und differenzieren sich nicht aus.

Es konnte in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass MDSCs T-Zellen hemmen, die für die Tumorerabwehr essentiell sind (KUSMARTSEV *ET AL.* (2005), ALMAND *ET AL.* 2001). Diese Arbeit beschäftigt sich vor allem mit der inhibitorischen Wirkung von MDSCs auf die Expansion und Zytokinproduktion von T-Zellen. Ein eindeutiger inhibitorischer Effekt der MDSCs *in vivo* konnte bis jetzt noch nicht erbracht werden.

2.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Onkogenese und Tumorerprogression

Im Jahr 1863 wies Rudolph Virchow in seiner Vorlesungsreihe „Die krankhaften Geschwülste“ (VIRCHOW 1863-67) schon auf einen Zusammenhang zwischen Entzündung und Neoplasien hin. Er zog damals den Schluss, dass aus einer Entzündung ein Tumor entstehen könnte. Heute wissen wir, dass das Immunsystem eine zentrale Rolle in der Tumorerogenese und Tumorerprogression spielt. Das wachsende Verständnis des Immunsystems zeigt die Prozesse der Inflammation, die während einer Onkogenese eine Rolle spielen. Chronische Infektionen oder Entzündungen können zu Neoplasien führen. Als Beispiel sei nur auf die erhöhte Inzidenz von kolorektalen Tumoren bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hingewiesen (EKBOM *ET AL.* 1990). Außerdem spielt das Immunsystem auch beim Wachstum und der Unterhaltung von Tumoren eine Rolle.

Beispielsweise töten Tumor-assoziierte Makrophagen nicht nur Tumorzellen, sondern fördern auch das Tumorwachstum. Dies bewerkstelligen sie unter anderem durch Begünstigung der Angiogenese (LEEK *ET AL.* 1996, BINGLE *ET AL.* 2006) über die gesteigerte Sezernierung von angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie VEGF. Durch Induktion von Matrix-Metalloproteasen fördern sie zudem die Metastasierung von Tumoren (HAGEMANN *ET AL.* 2004). MDSCs oder zumindest die MO-MDSCs zeigen einige Parallelen zu Tumor assoziierten Makrophagen. Daher werden sie von einigen Autoren als ein und dieselbe Zellpopulation betrachtet (UMEMURA *ET AL.* 2008). Weitere Forschung ist hier nötig um diese Fragen zu klären.

2.5 MDSCs bei inflammatorischen Erkrankungen

Sowohl im Menschen als auch in der Maus stellen MDSCs eine wichtige Zellpopulation dar, die bei entzündlichen Erkrankungen wie Sepsis (DELANO *ET AL.* 2007), Trauma (MAKARENKOVA *ET AL.* 2006) oder Tumorerkrankungen (YOUN *ET AL.* 2008) eine signifikante Expansion zeigen. Bei gesunden Mäusen findet man 2-4% MDSCs in der Milz, wohingegen bei tumortragenden Mäusen sich der Anteil der MDSCs an den Splenozyten je nach Tumormodell auf 20-40% erhöht. Ähnlich erhöhte MDSC-Zahlen findet man ebenso bei vielen anderen entzündlichen Erkrankungen wie zum Beispiel GvHD, Autoimmunerkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei bestimmten bakteriellen Infektionen wie *Leishmania major*, Helminthen, *Candida albicans* (MENCACCI *ET AL.* 2002) oder Toxoplasmose (VOISIN *ET AL.* 2004). Dort spielen die MDSCs als hemmende Zellen wahrscheinlich eine zentrale Rolle im Rahmen einer Immunregulation. Die immunsupprimierende Wirkung erfolgt wahrscheinlich über eine Arginin- oder Cytosindepletion sowie über die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie Sauerstoffradikale (O_2^-), Stickstoffmonoxid (NO) oder Peroxynitrit ($ONOO^-$). Hier kommen den Enzymen Arginase-I und iNOS Schlüsselrollen zu (TALMADGE 2007). Dass die Immunsuppression zumindest bei Tumorerkrankungen zu einem gewissen Maß spezifisch sein muss, zeigt die klinische Erfahrung, wonach onkologische Patienten erst bei fortgeschrittener Erkrankung eine generelle Immunsuppression erfahren, die MDSC Fraktion jedoch schon früher erhöht ist. MDSCs stellen somit eine suppressive Zellpopulation dar, die bei vielen inflammatorischen Erkrankungen expandiert.

2.6 Therapiemöglichkeiten bei Tumorerkrankungen durch Immunmodulation

In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um das Immunsystem bei der Bekämpfung von neoplastischen Erkrankungen zu unterstützen oder zu nutzen. Eine der ersten Immuntherapien, die breit eingesetzt wurde, war wohl die Instillation von BCG (*Bacille-Calmette-Guérin*) bei oberflächlichen Blasenkarzinomen (MORALES *ET AL.* 1976). Die Verwendung von Antikörpern erwies sich als weitere Therapieoption. Monoklonale Antikörper haben seit der

Einführung von Rituximab (COIFFIER *ET AL.* 1998) breite Anwendung in der Therapie von nicht soliden Tumoren gefunden. Später wurde diese Entwicklung durch bivalente Antikörper ergänzt. Als Beispiel sei Catumaxomab zu nennen. Dieser bivalente Antikörper bindet zum einen an T-Zellen und zum anderen über EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) an epitheliale Tumoren (RUF *ET AL.* 2007) und bringt so T-Zellen in die direkte Nachbarschaft von Tumorzellen. Mittlerweile ist eine Vielzahl von Antikörpern in der Therapie von soliden und nicht soliden Tumoren zugelassen. Es wurden weitere Ansätze erforscht. Hierunter zählten Versuche, das adaptive Immunsystem gegen Tumorantigene zum Beispiel durch DC Vaccinierungen zu richten. Ein Problem bei Immuntherapien ist oft der Immunescape des Tumors. Dieser wird durch verschiedene immunmodulierende Mechanismen verursacht, die normalerweise zur unabdingbaren Begrenzung der Immunreaktion beitragen. Dazu gehört unter anderem die Induktion von Anergie. Hier ist die Applikation von Immunstimulanzien eine Möglichkeit den Immunescape, also die Fähigkeit des Tumors sich vor dem Immunsystem zu verstecken, zu überwinden. Der zuletzt genannte Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von MDSCs untersucht, da diese aufgrund ihrer suppressiven Eigenschaften ein mögliches Therapieziel bei malignen Tumorerkrankungen darstellen.

2.7 Fragestellung und Ziel

Chemotherapien, die im Rahmen einer onkologischen Behandlung durchgeführt werden, konnten in den letzten Jahrzehnten beachtliche Erfolge verbuchen. Optimierte Therapieprotokolle mit additiven Therapeutika zur Kontrolle der Nebenwirkungen haben dieser Therapieform im klinischen Alltag einen beachtlichen Stellenwert eingebracht. Eine Heilung ist allerdings auch heute mit den klassischen chemotherapeutischen Ansätzen meist nur in seltenen Fällen möglich. Neue Ansätze liefern hier Immuntherapien, die bereits vielversprechende Ergebnisse vor allem bei Antikörpertherapien bei nicht soliden Tumoren geliefert haben. Gerade in den letzten Jahren hat es sich bei soliden Tumoren gezeigt, dass die Immunevasion des Tumors ein erhebliches Problem darstellt. Immuntherapien erzielen hierbei, durch eine Gegenregulation des Immunsystems im Tumor, nur eine geringe Wirkung oder die gewünschte Immunreaktion gegen den Tumor bleibt vollständig aus. Hier ist nach wie vor die grundlagenwissenschaftliche Forschung gefragt, neue therapeutische Ansätze zu schaffen um dieses Problem zu bewältigen. Eine Zellart die bei der Immunevasion von Tumoren wahrscheinlich eine große Rolle spielt sind die sogenannten *Myeloid-derived suppressor cells* (sogenannte MDSCs). Diese Zellen haben das Potential eine Immunreaktion gegen den Tumor zu supprimieren und dadurch dessen Immunevasion zu unterstützen. Wegen dieser Eigenschaften stellen MDSCs mögliche Schlüsselzellen der Immunevasion dar und machen sie zu einem interessanten Therapieziel.

Die vorliegende Arbeit baut dabei auf bereits vorangegangenen Arbeiten auf, in denen gezeigt werden konnte, dass MDSCs *in vivo* durch Immunstimulanzen wie CpG positiv in ihren Eigenschaften beeinflusst werden. Ziel dieser Arbeit war es, die MDSCs im Tumormodell genauer zu charakterisieren und den Wirkmechanismus der immunmodulatorischen Therapie *in vitro* nachzustellen, um diesen besser zu verstehen.

Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Frage wie es zu einer Disinhibition der MDSCs durch CpG kommt. Hier galt es mehrere mögliche zugrundeliegende Mechanismen zu untersuchen: kommt es durch die Therapie zu einer direkten Disinhibition der MDSCs oder zu einer Differenzierung in weniger supprimierende Zelltypen?

Weiter stellte sich die Frage, ob die Therapie mit CpG durch eine direkte Wirkung auf MDSCs zustande kommt oder ob diese indirekt über Cytokine durch eine weitere Zellart vermittelt wird. Während der experimentellen Phase warf sich zudem die Frage auf, wie lange MDSCs *in vitro* lebensfähig sind und wie man diesem Problem bei experimentellen Fragestellungen entgegen kann.

Die Untersuchungen erfolgten in tumortragenden Mäusen, sowie in den zugehörigen *in vitro* Modellen. Zur Charakterisierung wurden die MDSCs oder mögliche Vermittlerzellen *in vitro* mit CpG stimuliert und anschließend mit einer breiten Palette an immunologischen, zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht, um die Fragen zu beantworten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kulturmedien

<i>T-Zell Medium (TZM)</i>	<ul style="list-style-type: none">- RPMI-1640 Very-Low-Endotoxin Medium- 10 Vol.-% FCS, hitzeinaktiviert- 1 Vol.-% Penicillin/Streptomycin- 1 Vol.-% L-Glutamin- 1 Vol.-% NEAA- 1 Vol.-% Natriumpyruvat- 10^{-4} Vol.-% 2-Mercaptoethanol
<i>MGC-3 bzw. MGC-8 Medium</i>	<ul style="list-style-type: none">- DMEM high Glucose- 10 Vol.-% FCS Gold hitzeinaktiviert- 1 Vol.-% Penicillin/Streptomycin- 1 Vol.-% L-Glutamin- 1 Vol.-% NEAA- 1 Vol.-% Natriumpyruvat
<i>C26 Medium</i>	<ul style="list-style-type: none">- DMEM- 10% FCS hitzeinaktiviert- 2 mM L-Glutamin- 100 IU/ml Penicillin- 100 µg/ ml Streptomycin

3.1.2 Reagenzien

3.1.2.1 Chemikalien

2N H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FCS	GibcoBRL (Paisley, Großbritannien)
Isofluran (Forene®)	Abbott (Wiesbaden, Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Penicillin-Lösung	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

3.1.2.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.2.1 Fertiglösungen und Kits

(RPMI) 1640 Medium	Biochrom (Berlin, Deutschland)
BD Pharm Lyse™ LYSING BUFFER 10x	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Compensation Particles Set	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
DMEM Medium high glucose	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Dulbecco's PBS	PAA (Pasching, Deutschland)
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose	PAA (Pasching, Österreich)
Dynal® Mouse T-Cell Negative Selection Kit	Invitrogen (Ltd. Paisley, UK)
FACS Shut-down-Solution	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FACS-Clean	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
FACS-Flow	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Diagnostics Deutschland GmbH

	(Mannheim, Deutschland)
Mouse IL-2 ELISA	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza Rockland, Inc. (Rockland, USA)
PBS -Puffer	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
PharmLyse Lysepuffer 10x	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents	Invitrogen (Ltd. Paisley, UK)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 medium	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Trizol®	Molecular Research Center, Inc. (Cincinnati USA)
VLE RPMI 1640 medium (very low endotoxin)	Biochrom (Berlin, Deutschland)

3.1.2.2.2 Lösungsansätze

<i>FACS Lösungen</i>	- Färbe- und Waschpuffer:	- Dulbecco's PBS 2 Vol.-% FCS HI
	- Stammlösung für FACS Fixierung	- Dulbecco's PBS - 4 Gew.-% Paraformaldehyd (wird 1:1 mit Zellsuspension verdünnt)
<i>MACS Puffer</i>		- Dulbecco's PBS - 0,5 – 10 Vol.-% (je nach Experiment) - 2 mM EDTA
<i>Dynal Puffer</i>		- Dulbecco's PBS - 2 Vol.-% FCS
<i>ELISA Puffer</i>	- Coating Puffer 1	- 0.2 M Natriumphosphat (aq) pH = 6,5
	- Coating Puffer 2	- 0.1 M Natriumcarbonat (aq) pH = 9,5

	- Assay diluent	- 10% FCS in PBS pH = 7,0
	- Waschpuffer	- 0.05% Tween 20 in PBS
	- Entwicklerlösung	- BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set
	- Stopp-Lösung	- 2 N H ₂ SO ₄ Lösung

3.1.2.3 Biomoleküle und -verbindungen

MACS - Antikörper	
Anti - CD19	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti - CD11c	
Anti – CD3e-Biotin	
Anti - Ly6G	
Anti - Gr-1-Biotin	
Anti - Biotin Microbeads	

FACS-Antikörper	
Anti - Gr1	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) bzw. BioLegend (San Diego, USA)
Anti - CD11b	
Anti - Ly6G	
Anti - Ly6C	
Anti - MHC - II	
Anti - CD69	
Anti - CD80	
Anti - CD3	
Anti - CD11c	

RT-PCR	
Primer-Sequenzen	Metabion International AG (Martinsried, Deutschland)
TLR-9 L-Sequenz	GAA TCC TCC ATC TCC CAA CAT
TLR-9 R-Sequenz	CCA GAG TCT CAG CCA GCA CT
TLR-4 L-Sequenz	GGA CTC TGA TCA TGG CAC TG

TLR-4 R-Sequenz	CTG ATC CAT GCA TGG GTA GGT
SDHA L-Sequenz	TGT TCA GTT CCA CCC CAC A
SDHA R-Sequenz	TCT CCA CGA CAC CCT TCT GT
HPRT L-Sequenz	GGA GCG GTA GCA CCT CCT
HPRT R-Sequenz	CTG GGT GAT CAT CGC TAA TCA
HMBS L-Sequenz	TCC CTG AAG GAT GTG CCT AC
HMBS R-Sequenz	AAG GGT TTT CCC GTT TGC
<i>RT-PCR-probe</i> -Nummer	Universal Probe Library (UPL) Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
TLR-9 L-Sequenz	79
TLR-4 L-Sequenz	2
SDHA L-Sequenz	71
HPRT L-Sequenz	69
HMBS L-Sequenz	79

3.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Inzuchtstämme balb/c und C57BL/6 von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die SV40TA_g Mäuse stammten aus eigener Zucht.

3.1.3.1 *Das SV40-Modell*

Das SV40 Modell wurde im *Tumor Immunology Laboratory*, LIFE-Center, Klinikum Großhadern unter der Leitung von W. Zimmermann entwickelt (THOMPSON *ET AL.* 2000). Bei diesem Tumormodell handelt es um transgene C57BL/6 Mäuse, bei denen ein „SV40 virus large T Antigen“ (TA_g) unter der Kontrolle des CEA-Promotors exprimiert wird. SV40 TA_g ist ein starkes Onkogen, welches in verschiedenen transgenen Mausstämmen Verwendung findet, die spontane Tumore entwickeln. SV40 TA_g positive Mäuse entwickeln ab dem dreißigsten Lebensstag zu 100% Dysplasien in der Magenmukosa. Aus diesen Dysplasien entwickeln sich dann in den folgenden Tagen invasive Pyloruskarzinome. Die Überlebenszeit beträgt im Mittel circa 90 Tage. Die Mäuse wurden sakrifiziert, bevor sie durch die stenosierende Wucherung des Magentumors einen mechanischen Ileus entwickelten. Vorteil dieses Tumormodells ist, dass der Tumor sich spontan *in vivo* im Magen als Magentumor entwickelt. Spontan entwickelnde Tumoren zeigen ähnlichere Eigenschaften zu klinischen Tumoren in der Humanmedizin als subkutan induzierte Tumoren. Die s.c. beziehungsweise spontan induzierten Tumormodelle zeigen signifikante Unterschiede z. B. im Wachstum, in dem sie umgebenden Gewebe. Weiterhin fehlen subkutan induzierten Tumoren die prämaligen Vorläuferläsionen, die durchaus immunologische Effekte aufweisen. Dies zeigt sich in

einigen Tumormodellen z. B. durch eine unterschiedliche Infiltration von CD8 positiven Zellen (GARBE *ET AL.* 2006, BOURQUIN *ET AL.* 2010). Darüber hinaus standen für weitere Versuche Tumorzelllinien zur Verfügung, die aus diesem Tumor abgeleitet wurden. Beide verwendeten Zelllinien (*mGC-8* und *mGC-3*) stammten aus dem oben genannten Labor (NÖCKEL *ET AL.* 2006).

3.1.4 Verwendete Geräte und Software

3.1.4.1 Geräte

Steril-Arbeitsplatz	HERAsafe KS; Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Canto II; Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
ELISA und Fluoreszenz-Plattenleser	Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader; BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland)
Eppendorf Pipetten	Eppendorf Pipetten
Handdispenser	Multipette® plus; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Inversmikroskop	Axiovert 25 Zeiss Jena
Kühlschränke	
MACS-Magnet mit Ständer	QuadroMACS + MultiStand; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
MACS-Säulen	LD-, LS- oder MS-Column; Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikroliterpipetten	Eppendorf Research®; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mikrozentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5417 R; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht (Balgach, Schweiz)
pH-Meter	
Photometer	NanoPhotometer, Implen GmbH (München, Deutschland)
Pipettierhilfe	Easypet®; Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
RT-PCR- Gerät	LightCycler 480II, Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Tischzentrifuge	
Vortex	
Vortex Schüttler	Vortex VF2; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen Deutschland)

Vortex Schüttler	MS 3 basic; IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen Deutschland)
Wärmeschrank	BD 6220; Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Multifuge 3L-R; Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)

3.1.4.2 Software

BIBUS	OpenSource Zitierungssoftware unter GNU General Public License, Free Software Foundation, Inc. (Boston, USA); http://bibus-biblio.sourceforge.net/
BKchem	OpenSource Molekül-Design Programm unter GNU GPLv3
EXOR4	Datenbank für Lightcycler®480-Software 1.5 Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
FACSDiva	FACS-Plot Software, Becton Dickinson (San Jose, USA)
FlowJo 7.6	FACS-Plot Software, Tree Star (Ashland, USA)
GNU Image Manipulation Program (GIMP)	OpenSource Grafik Software unter GNU General Public License (http://www.gimp.org/)
Inkscape	OpenSource Vektorgrafik Software unter GNU General Public License http://www.inkscape.org/
Lightcycler® 480-Software 1.5	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
MikroWin 2000	Software für MithrasReader, Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
OpenOffice	OpenSource Office Program, Sun Microsystems Inc., OpenOffice.org community
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

3.1.5 Sonstiges Material

Einweg Kunststoffsterilgut wie z. B. Zellkulturflaschen, Pipetten, FACS Röhrchen wurde bei folgenden Firmen beschafft:

B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)

Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, Großbritannien)

Corning (Corning, USA)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Falcon (Heidelberg, Deutschland)

Greiner (Frickenhäusen, Deutschland)

Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, Deutschland)

Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuche

In der Versuchstierhaltung wurden die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes konsequent umgesetzt. Die Tierversuche waren alle durch die Regierung von Oberbayern im Tierversuchsantrag TVA 99/07 genehmigt.

3.2.1.1 Versuchstierhaltung

In einem Käfig wurden maximal acht Tiere zusammen in einem Käfig gehalten. Ihr gesundheitlicher Zustand wurde täglich von ausgebildeten Tierpflegern sowie regelmäßig von wissenschaftlich erfahrenen Mitarbeitern kontrolliert. Hierbei wurde insbesondere auf Verhaltensauffälligkeiten, Anzeichen von Stress, Fellbeschaffenheit sowie Tumorgrößen geachtet. Bei Erreichen eines Grenzparameters wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation sakrifiziert. Die Tumorgröße wurde dreimal pro Woche durch eine Schublehre ermittelt. Hierfür wurde der Tumordurchmesser parallel zur Körperoberfläche in den zwei größten Tumordiagonalen vermessen. Das daraus ermittelte Produkt ergab die Tumor Oberfläche. Als maximale Tumorgröße war eine Fläche von 225 mm² festgelegt.

3.2.1.2 Tumorinduktion

Die notwendigen Tumorzellen wurden aus kultivierten Zelllinien gewonnen (siehe 3.2.2.4.1). Zur Tumorinduktion wurden die Tumorzellen vom Boden der Kulturflaschen mit Hilfe eines

Zellschabers gelöst und durch eine gelbe Kanüle gespült um die Zellen zu vereinzeln. Die Einzelzellsuspension wurde in PBS gewaschen und anschließend mit PBS auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Die Tumorinduktion selbst erfolgte durch die subkutane Injektion dieser PBS-Tumorzellsuspension. Die Menge an Tumorzellen richtete sich nach der Tumorart, die Injektionsmenge war auf 100 µl begrenzt. Bei den *mGC-8* Zelllinien wurden pro Tumorinduktion 2×10^6 Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und jeweils in die rechte Flanke injiziert. Bei der Induktion von C26 Tumoren wurden dahingegen $2,5 \times 10^5$ Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und injiziert.

3.2.1.3 Organentnahme

Die Mäuse wurden zunächst durch Isofluran narkotisiert und anschließend mittels cervicaler Dislokation getötet. Um eine gewisse Sterilität zu gewährleisten, erfolgte anschließend eine Fell-Desinfektion mit 70 Vol.-% Isopropanol.

3.2.1.3.1 Milz

Bei der Milzentnahme wurde das Fell mit einer Schere linkslateral gespalten und das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde mit zwei anatomischen Pinzetten stumpf vom umliegenden Fettgewebe befreit und nach Durchtrennen des Lig. gastrosplenicum entnommen und in eisgekühltes steriles PBS überführt. Die Vereinzelung der Milzzellen wird unter 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.1.3.2 Knochenmark

Nach der Sakrifizierung wurden der Femur sowie die Tibia mit Zellstoff von Muskeln befreit. Daraufhin wurden die Epiphysen abgetrennt und das Knochenmark mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle mit PBS ausgespült. Das Knochenmark wurde anschließend durch ein 70µm BD-Nylon Sieb passiert und in PBS gewaschen.

3.2.1.3.3 Tumor

Die Entnahmestelle wurde mit 70% Isopropanol desinfiziert und anschließend der subkutane Tumor zirkulär exzidiert. Je nach Untersuchung wurde nur der Tumor ohne Haut exzidiert. Hierfür wurde die Haut gespalten und der Tumor mit Kapsel ausgeschält.

3.2.1.4 *Adoptiver Zelltransfer*

Bei adoptiven Transferexperimenten wurde die Maus zunächst mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde das Nackenfell der Maus nach kaudal gespannt, sodass es zu einem Exophthalmus (hervortreten der Augen) kam. Anschließend wurden die Zellen langsam in den retroorbitalen Venenplexus mit Hilfe einer Insulinspritze injiziert. Bei dem adoptiven Transfer wurden $4,5 \cdot 10^6$ Zellen übertragen.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 *Gewinnung der Splenozyten*

Alle Experimente bei denen die Zellen anschließend kultiviert wurden fanden ab der Organexplantation unter sterilen Bedingungen statt. Hierfür wurden sämtliche nachfolgenden Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Gewinnung einer Splenozyten-Zellsuspension wurde die Milz durch ein 40 µm Nylon-Zellsieb passiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet je nach Größe mit 2 bis 3 ml Erylyse für zwei Minuten lysiert um die Zellsuspension von Erythrozyten zu befreien. Der Lysevorgang wurde mit 50 ml PBS gestoppt. Die Splenozyten wurden daraufhin bei 400 m/s^2 für 7 Minuten herunterzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde danach noch einmal mit 5 ml PBS gewaschen und für die nachfolgenden Experimente auf den jeweiligen Puffer eingestellt.

3.2.2.2 *Isolation der MDSCs*

Zur Isolation der einzelnen MDSC Fraktionen wurde vorwiegend das sogenannte „*magnet acquired cell sorting*“ (MACS) Verfahren verwendet. Beim MACS werden Zellen zunächst an einen primären Antikörper gebunden, an dem einen magnetischen Partikel gebunden ist. Als weitere Möglichkeit steht die Bindung eines sekundären Partikel-gekoppelten Antikörpers an einen Primären Biotin-gekoppelten Antikörper zu Verfügung. Die Partikel-gekoppelten Antikörper wurden von der Firma Miltenyi bezogen. Die Mikropartikel bestehen aus Eisenoxid, welches dem Antikörper ferromagnetische Eigenschaften verleiht. So können Partikel-gekoppelte Zellen in einem Magnetfeld zurückgehalten werden. Diese sogenannten Mikrobeads benötigen für eine effektive Aufreinigung ein Magnetfeld mit sehr hohen Feldstärken. Um dieses zu erzeugen, werden die Partikel-gekoppelten Zellen über eine Säule aufgereinigt, die mit ferromagnetischen Kügelchen gefüllt ist. Diese Partikel leiten das extern angelegte Magnetfeld fast verlustfrei weiter. Die Zellsuspension wird in einem Puffer über die Säulen gespült. Als Durchlauf bezeichnet man dann den Teil der Zellen, der trotz anliegendem Magnetfeld die Säulen frei passiert. Dagegen befinden sich im Eluat die Zellen, die in der Säule durch das magnetische Feld in der Säule zurückgehalten

und mit einem Stempel und 5 ml MACS Puffer aus der Säule gespült werden, nachdem der Magnet entfernt worden ist (Abbildung 2).

Prinzip des ersten MACS Schrittes

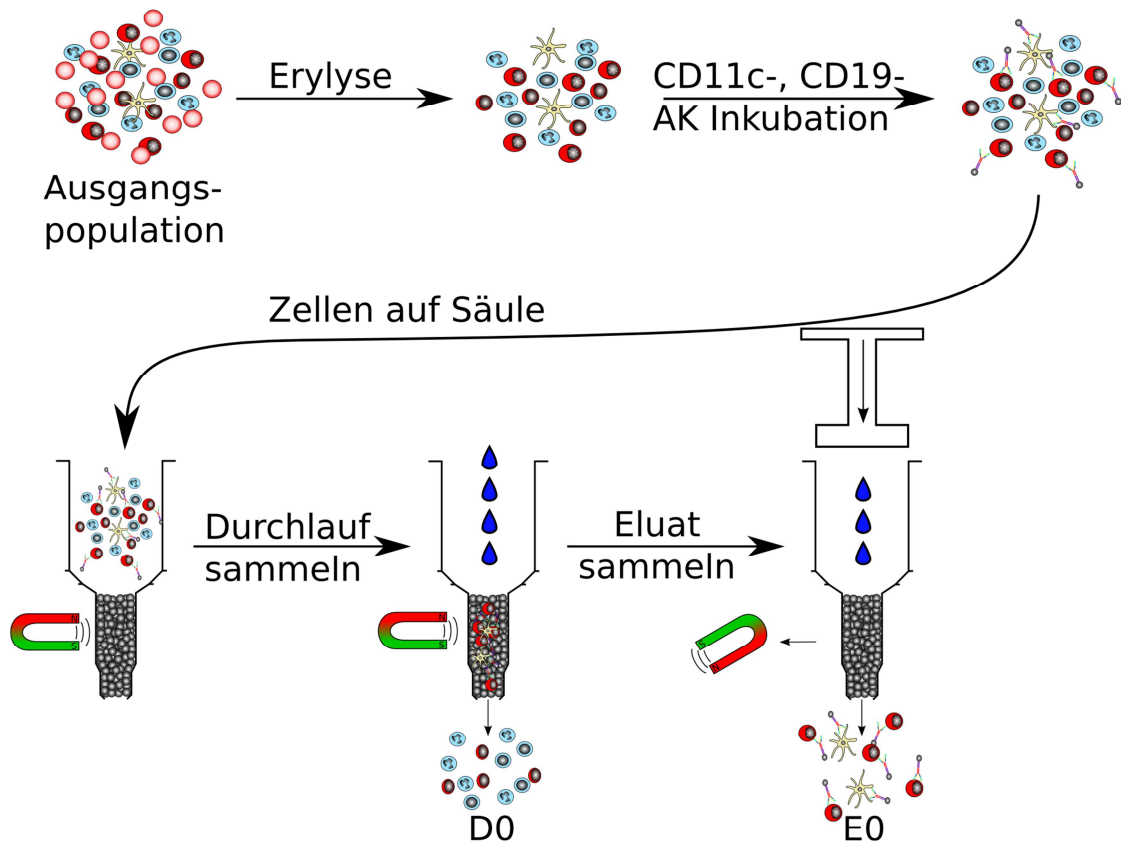


Abbildung 2: Prinzip der MACS-Aufreinigung (erster Schritt der MDSC Anreicherung). Splenozyten werden zunächst von Erythrozyten mittels Erylyse befreit. Anschließend erfolgt die Bindung der magnetischen Partikel. Im nächsten Schritt werden die Zellen über eine magnetische Säule in zwei Fraktionen getrennt. Dies geschieht durch ausspülen der Partikel-freien Zellen und anschließendem Eluieren der in der Säule zurückgehaltenen Zellen.

Die Aufreinigung der MDSCs erfolgte in mehreren Schritten. Im Folgenden ist eine Aufreinigung von 10^8 Splenozyten beschrieben:

Die Splenozyten wurden wie oben beschrieben isoliert und auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml auf MACS Puffer eingestellt und mit je 100 μ l Partikel-gekoppelten Anti - CD19 und Anti-CD11c Ak für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Mit dieser Negativselektion wurden B-Zellen und dendritische Zellen depletiert. Später wurde dieser Schritt um eine CD3 Negativselektion erweitert. Hierzu wurden die T-Zellen als erstes mit einem Biotin gekoppelten Anti - CD3 ϵ Ak markiert und anschließend mit einem Partikel gekoppelten Anti - Biotin - Antikörper magnetisch

markiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 6 ml MACS-Puffer gewaschen, in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine im magnetischen Feld befindlichen MACS-Säule gegeben, die 15 Minuten mit MACS-Puffer vorinkubiert wurde. Diese Vorinkubation sollte die unspezifische Zelladhäsion in der Säule durch das im MACS Puffer enthaltene FCS verringern. Der erste Durchlauf (im Folgenden als D0 bezeichnet) wurde in einem eisgekühlten Falcon-Gefäß aufgefangen. Die Säule wurde noch dreimal mit 3 ml MACS Puffer gespült, um alle nicht markierten Zellen zu entfernen. Die in der Säule befindlichen Zellen wurden für die nachfolgende durchflusszytometrische Kontrolle eluiert (E0). Im zweiten Schritt wurden die PMN-MDSCs isoliert. Dafür wurde der Durchlauf D0 mit 50 µl anti-Ly6G-Biotin gekoppeltem Antikörper für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde nach der Inkubation 150 µl MACS Puffer und 100 µl Anti-Biotin-Microbead Antikörper zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Vor der Aufreinigung über eine MACS Säule wurden die Zellen in 10 ml MACS Puffer gewaschen. Der folgende Aufreinigungsschritt war identisch mit dem ersten. Man erhält das Eluat E1, in dem die PMN-MDSC angereichert sind, und den Durchlauf D1, aus dem im nächsten Schritt die MO-MDSCs aufgereinigt wurden. In diesem letzten Schritt wurden die MO-MDSCs angereichert. Die Zellen in D1 wurden, wie im Schritt zwei beschrieben, gewaschen und mit Biotin-Anti-Gr1 Antikörpern für 10 Minuten bei 4 °C und anschließend mit Anti-Biotin-Antikörpern für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der Gr1-Antikörper zeigt eine Kreuzreaktion mit Ly6G und Ly6C, so dass im Eluat alle restlichen MDSCs, aber vor allem die MO-MDSCs angereichert wurden. Man erhält D2 und E2 (siehe Abbildung 3).

Von den Splenozyten, von sämtlichen Diluaten und Eluaten wurden Proben für eine durchflusszytometrische Qualitätskontrolle entnommen. In diesen routinemäßigen FACS Kontrollen wurden in der Regel die Oberflächenantigene Gr1, CD11b, Ly6C, Ly6G, CD 11c, B220 und CD3 gefärbt, um die einzelnen Aufreinigungsschritte zu überwachen und um unerwünschte Zellkontaminationen in der späteren Auswertung berücksichtigen zu können.

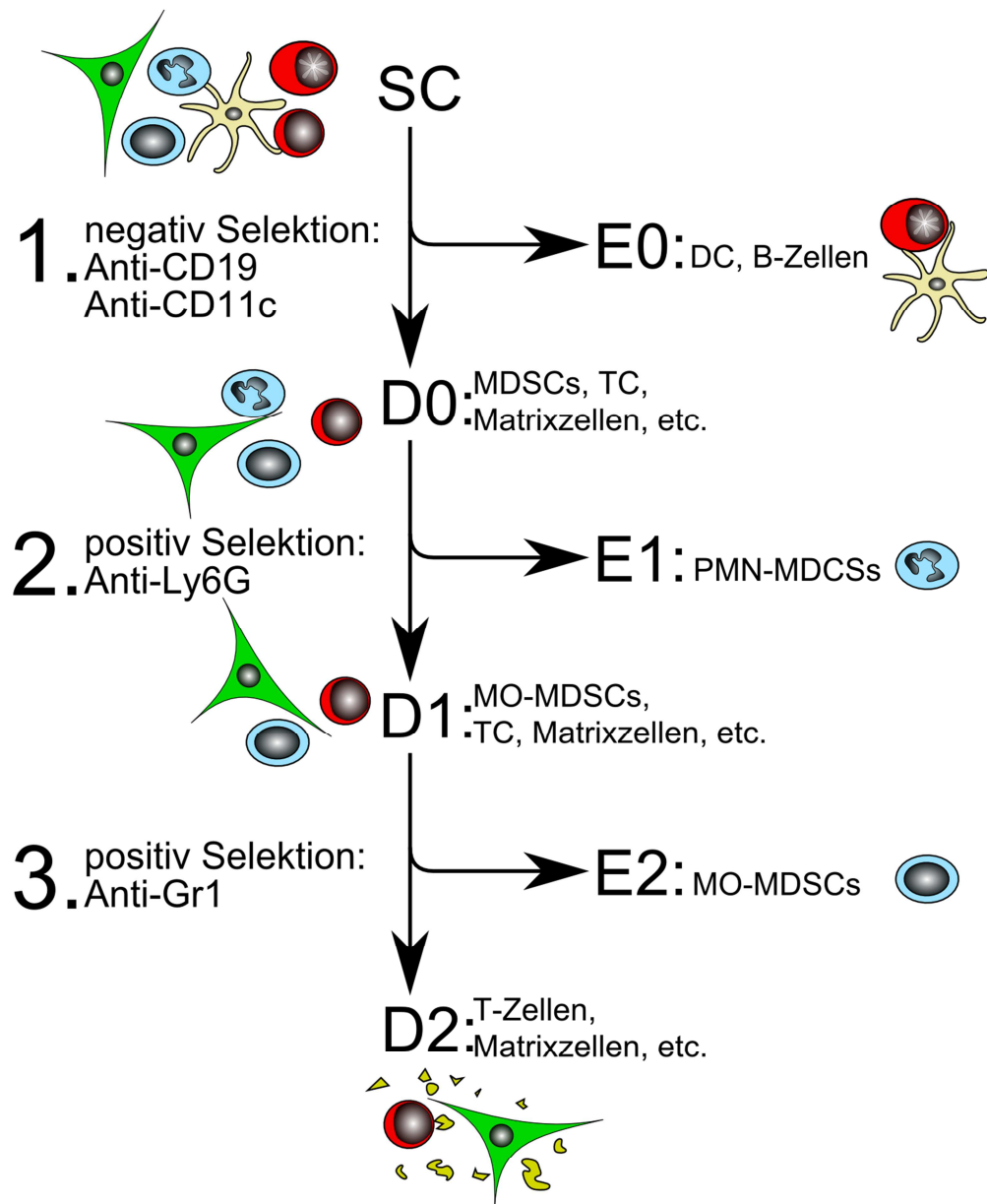


Abbildung 3: Schema der MDSC-Aufreinigung (idealisiert)

Der Vorteil dieser Methode liegt in der breiten Verfügbarkeit aufgrund der geringen apparativen Investitionskosten, der hohen Zellausbeute und einer geringeren mechanischen Belastung als beim FACS Sort. Zudem ist sie methodisch relativ einfach in ihrer Durchführbarkeit. Der Nachteil ist allerdings, dass man die Zellen nur anreichern kann, aber nie eine Reinpopulation erhält. Zudem dauert die Aufreinigung verhältnismäßig lange, was zur Folge hat, dass die Zellen zwangsläufig einem oxidativen Stress ausgesetzt werden.

3.2.2.3 T-Zell Aufreinigung

Die T-Zellen wurden mit Hilfe des „Mouse T Cell Negativ Isolation Kit“ von Invitrogen isoliert. Hier wurde als Aufreinigungsmethode die Negativselektion gewählt bei der alle Zellen außer den T-

Zellen weggefangen werden. Dies hat den Vorteil, dass eine Aktivierung der T-Zellen durch Antikörper, die an Oberflächenrezeptoren der T-Zelle binden würden, vermieden wird. Dafür wurden die Splenozyten wie unter 3.2.2.1 beschrieben isoliert. Für die erste Antikörper-Inkubation wurden die Splenozyten auf eine Konzentration von 10^8 Zellen/ml in Dynal Puffer eingestellt. Um die Rate an unspezifischen Antikörperbindungen zu verringern, wurde die erste Inkubation mit einer erhöhten FCS Konzentration von ca. 20 Vol.-% durchgeführt. Daraufhin wurden pro 10^7 Zellen 20 μ l einer Antikörper-Mischung hinzugefügt und bei 4 °C im Kühlschrank für 20 Minuten inkubiert. Die Antikörpermischung bestand aus einer Kombination von Anti-CD45R (gegen B-Zellen gerichtet), Anti-CD11b (vor allem gegen myeloide Zellen), Anti-Ter119 (gegen erythroide Zellen) und Anti-CD16/32 (gegen FC Rezeptor/B-Zellen) Rattenantikörpern. Während der Inkubationszeit wurden für 10^7 Zellen 200 μ l Dynabeads, die mit polyklonalen Schaf-anti-Ratten Ak gekoppelt waren, gewaschen um ungebundene Ak zu entfernen. Hierfür wurden die Partikel 1:1 (v/v) mit Dynal Puffer verdünnt. Danach wurde die Partikel-Suspension für zwei Minuten an einen Permanentmagneten gehalten und die Flüssigphase abgenommen. Die zurückgehalten Partikel wurden auf das Ausgangsvolumen mit Dynalpuffer eingestellt, von dem Magneten entfernt und resuspendiert. Die inkubierten Splenozyten wurden mit 2 ml Dynal Puffer/ 10^7 Zellen verdünnt, bei 300 m/s^2 8 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 800 μ l/ 10^7 Zellen resuspendiert und mit 200 μ l gewaschenen Partikel für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mehrere Male mit einer 1000 μ l Eppendorf-Pipette aufgenommen, um etwaige Zelladhäsionen zu lösen. Diese Suspension wurde 1:1 (v/v) mit Dynalpuffer verdünnt und in einem Tube für 2 Minuten an einen Magneten gehalten. Der Überstand, der die T-Zellen enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt.

3.2.2.4 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten für die Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank mit Einwegsterilgut durchgeführt. Für Zellkulturmedien wurden vorgefertigte RPMI oder DMEM Medien mit Zusätzen erweitert (siehe 3.1.1). FCS wurde in 50 ml Aliquots bei 56 °C für 30 Minuten hitzeinaktiviert um hitzelabile Viren und Mycoplasmen zu dezimieren. Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte in einem Heraeus Brutschrank unter konstanten Bedingungen bei 36 °C, 96% relative Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Die Zellkulturen wurden regelmäßig im Lichtmikroskop auf Wachstum und bakterielle Dekontamination hin untersucht. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter einem inversen Lichtmikroskop. Dabei wurden mit Hilfe einer Trypanblaufärbung tote Zellen von der Zählung ausgeschlossen.

3.2.2.4.1 Tumorzelllinien und ihre Verarbeitung

Tumorzelllinien wurden in Zellkulturflaschen gezüchtet. Die Zellen wurden dabei unter konstanten Bedingungen bei 36 °C und einer Atmosphäre mit 96% rel. Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten. Die Zelllinien wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Konfluenz und Kontamination kontrolliert. Bei einer Konfluenz von circa 90% wurde die Kultur gesplittet. Hierfür wurden die Zellen mit einem Scraper vom Flaschenboden abgelöst und mit Hilfe einer Spritze und einer gelben Kanüle vereinzelt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Tube überführt und bei 400 g für 7 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Medium durch frisches ersetzt. Anschließend wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Um sicher zu stellen, dass es nicht zu einer Kontamination mit Mycoplasmen kam, wurden die Zelllinien regelmäßig einem Mycoplasmentest der Firma Lonza unterzogen.

SV40 korrespondierende Zelllinien

Sowohl die *mGC-3* als auch die *mGC-8* sind neoplastische Zelllinien, die aus induzierten Magentumoren weiblicher SV 40 Mäusen stammen (siehe auch Kapitel 3.1.3.1). Da SV 40 Mäuse einen C57BL/6 Hintergrund besitzen, wurden auch die korrespondierenden Zelllinien in C57BL/6 Mäusen induziert. Die Zucht erfolgte wie oben beschrieben. Bei den *mGC-8* Tumorzellen wurden allerdings nur 80% des Mediums ersetzt, um Zytokine beizubehalten und um das Tumorwachstum zu optimieren. Bei einer Zellpassage wurden die Zellen auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt.

C26

Die C26 Colon-Karzinom-Zelllinie leitet sich von einem durch rektale Injektion mit Methylnitrosoharnstoff induzierten Grad IV Colonkarzinom ab (CORBETT *ET AL.* 1975). Das C26 Modell stellt ein schon gut etabliertes und breit verwendetes Tumormodell mit Balb/c Hintergrund dar. Die Zellen wurden bei der Zucht bei jeder Passage auf 5 Zellkulturflaschen verteilt und das Medium entsprechend auf das Zielvolumen von 20 ml pro Kulturflasche ergänzt.

3.2.2.4.2 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden die Zelllinien wie unter 3.2.2.4.1 beschrieben expandiert. Die Zelllinien wurden vor der Kryokonservierung auf Mycoplasmen hin untersucht und bei negativem Testergebnis (Mycoplasmenausschluss) für die Kryokonservierung freigegeben. Anschließend wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen um Zelldebris abzutrennen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml auf das zugehörige Zelllinienmedium eingestellt. Pro Kryotube wurde 1 ml Zellsuspension überführt. Daraufhin wurde die Suspension mit Kryomedium (20%DMSO, 80% FCS) 1:1 verdünnt mit der Eppendorf Pipette kurz durchmischt und sofort in

einem -80 °C Kühlschrank eingefroren. Nach 15 Stunden wurden die Zellen für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.2.5 MDSC Hemmversuche durch Kokultivierung

Während der Hemmversuche wurden die MDSCs, soweit nicht anders angegeben, in 96-well Platten mit den Zielzellen kokultiviert. Für die Bestückung der Platten wurden die Eluate so lange in MACS Puffer auf Eis gestellt, bis das letzte Eluat aufgereinigt war. Erst dann wurden alle Eluate gemeinsam auf T-Zell Medium eingestellt und auf die Platten verteilt. Dies war notwendig, um einen Bias durch unterschiedlich lange „Hungerperioden“ zu vermeiden. Die Zellsuspensionen wurden zur Plattenbestückung einzeln mit einer Eppendorf-Pipette in die Wells pipettiert, da dies die genaueste und gleichzeitig flexibelste Methode ist. Multistepper wurden hierfür in Reihenuntersuchungen als zu ungenau befunden. Während der Pipettierung wurden die Zellen in dem Vorratsgefäß ständig geschwenkt um eine Sedimentation zu verhindern. Zudem wurde nach jedem Pipettiervorgang die Spitze gewechselt, um ein gleichmäßiges Pipettieren zu gewährleisten und eine Kreuzkontamination zu verhindern. Es wurden pro Well maximal 200 000 Zellen in 200 µl Medium kultiviert. Die verschiedenen Zellsuspensionen wurden in die Wells verteilt und anschließend mit TZM auf 200 µl aufgefüllt. Zum Schluss wurden die Zellen, soweit nicht anders vermerkt, gemeinsam mit CD3/CD28 Beads aktiviert. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da sie eine Aktivierung durch dendritische Zellen imitiert und so der natürlichen Stimulation näher kommt als eine Aktivierung über CD3-Ak oder Zytokine. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass das Experiment mit diesen Beads „gestartet“ werden konnte und somit ein gleichzeitiger Start aller Bedingungen im Experiment erfolgte. Die Zellen wurden anschließend in der Regel für 48 Stunden inkubiert. Erst dann erfolgte der Readout oder eine BrdU Zugabe (siehe 3.2.4.2). Sämtliche Werte wurden mindestens als Triplets und, wenn es die Zellzahlen zuließen, als Verdünnungsreihen angelegt, um etwaige Schwankungen und Fehlerwerte zu ermitteln.

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 FACS

FACS (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) ist eine Methode, mit der Zellpopulationen auf Oberflächenmarker hin untersucht werden können. Vorteil ist eine hohe Flexibilität sowie ein hoher Zell-Durchsatz bei der Untersuchung.

3.2.3.1.1 Prinzip der Durchflusszytometrie und des Zellsorting

Die erste fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde 1968 von Wolfgang Göhde an der Universität Mainz unter dem Namen Impulszytophotometrie entwickelt (DITTRICH & GÖHDE

1968). Das Messprinzip hat sich seit dem nicht geändert. Zellen (bzw. Partikel) werden zunächst mit fluoreszierenden Farbstoffen angefärbt. Anschließend wird die Zellsuspension mit Hilfe eines laminaren Mantelstroms in einen (idealerweise) ein-Zell breiten Strahl auseinandergezogen, sodass die Zellen einzeln nacheinander einen Laserstrahl durchlaufen. Dieser besitzt eine Wellenlänge im Exzitationsbereich des Fluorochroms und regt dieses an. Es werden folgende Messwerte ermittelt:

FSC: Der FSC (engl. *forward scatter*) oder das Vorwärtsstreulicht entsteht durch Beugung an der Zelle und wird bei fast 180° bezüglich des Laserstrahleinfalls gemessen. Diese Vorwärtsstreuung korreliert mit der Zellgröße.

SSC: Der SSC (engl. *side scatter*) oder die Seitwärtsstreuung wird durch Brechung und Reflexion an subzellulären Strukturen gebildet. Sie ist ein Maß für die Granularität einer Zelle.

Über diese zwei Größen wird eine Vorauswahl bzgl. Größe und Granularität getroffen. Zu kleine Partikel (Zelltrümmer, etc.) werden über den FSC vom Durchflusszytometer nicht erfasst, um Rechenleistung zu sparen. Die Granularität diene zudem in unseren Messungen als Kontrolle, ob es sich um granuläre Zellen wie PMN-MDSCs handelt. Zudem bietet ein FSC-SSC Diagramm Hinweise auf Fehlerquellen wie Dublettenbildung.

Die dritte Größe, die bei der Passage durch den Laser ermittelt wird, ist die Fluoreszenz, die von gefärbten Zellen emittiert wird. Dieses Fluoreszenzspektrum wird mit einem dichroitischen Filtersystem und nachgeschaltetem schmalbandigen Interferenzfilter in die verschiedenen farbstofftypischen Spektralbereiche geteilt. So können auf einem Partikel mehrere Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden, ohne dass es zu wesentlichen Helligkeitsverlusten kommt.

Mehrere Farbstoffe machen eine Kompensation notwendig, da sich die Spektren einiger Farbstoffe überlappen. Dafür werden vor der eigentlichen Messung Messwerte mit Einzelfärbungen ermittelt. Anhand dieser Einzelfärbungen kann die Software die Überschneidungen ermitteln und mathematisch kompensieren.

Der Durchflusszytometer, der für diese Dissertation verwendet wurde, war der FACS Canto II der Firma Becton Dickinson. In unserer Laborkonfiguration war er mit drei Lasern und acht Fluoreszenzkanälen ausgestattet.

Durchflusszytometrie und FACS werden oft als Synonyme verwendet, wobei ein FACS ein Durchflusszytometer mit anschließender Sortiereinheit darstellt. Dahingegen kann ein Durchflusszytometer nur messen. In dieser Dissertation werden im nachfolgenden Durchflusszytometer und FACS als Synonym verwendet. Die Zellsortierung mittels FACS wird als

„FACS-Sort“ bezeichnet. Abbildung 4 zeigt das Prinzip der Durchflusszytometrie.

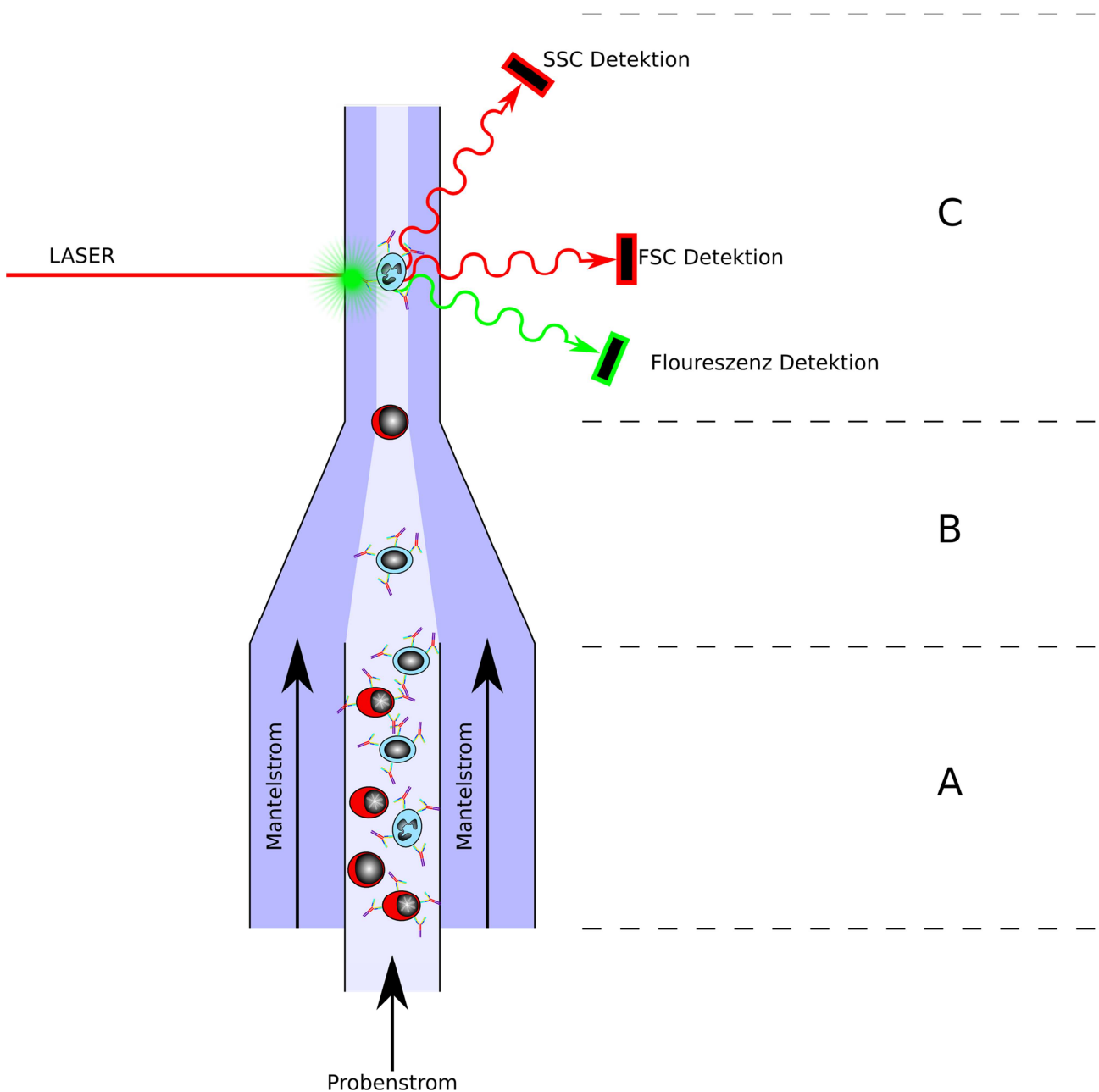


Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie. A: Probenstrom und Mantelstrom sind getrennt, die Zellen sind z.T. noch nebeneinander. B: In der Mischkammer zieht der laminare Mantelstrom den Probenstrom auseinander, sodass die Zellen hintereinander liegen. Die Zellen passieren so einzeln den Laser. C: im Messbereich regt der Laser die Fluorochrome die über Antikörper an die Zelle gebunden wurden an. Das emittierte Licht wird vom Fluoreszenzdetektor gemessen. Des Weiteren erfolgt die Messung vom FSC und 90° zum einfallenden Laserstrahl die Messung des SSC.

3.2.3.1.2 Probenvorbereitung

Für die Durchflusszytometrie sind Einzelzellsuspensionen erforderlich, die aus unterschiedlichen Geweben wie Milz, Tumor oder Blut gewonnen wurden. Meist wurden Splenozyten aus Mäusen

untersucht. Hierfür wurde die Milz durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von 40 µm passiert und gespült. Anschließend wurde die Suspension abzentrifugiert und im Pellet die Erythrozyten, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, lysiert. Blut wurde im Gegensatz zu der Milzzellensuspension zwei Mal für 10 Minuten lysiert. Tumore wurden für die FACS-Analyse zunächst mit Schere und Skalpell mechanisch zerkleinert und anschließend mit Trypsin/DNase für 30 Minuten bei 36 °C im Brutschrank verdaut. Die Zellsuspension wurde anschließend zuerst durch ein 70µm und dann ein zweites Mal durch ein 40µm Nylonsieb passiert und gespült. Splenozyten und Blutzellen wurden nach den Färbetechniken direkt durchflusszytometrisch analysiert. Tumorzellen wurden dahingegen direkt vor dem FACS noch einmal durch ein Nylonsieb 40µm gespült um Dubletten zu vereinzeln und einem Verstopfen des FACS-Gerätes vorzubeugen.

3.2.3.1.3 Oberflächenfärbung

Pro FACS-Tube wurden ca. 5×10^5 bis 10^6 Zellen gefärbt. Diese Zellen wurden pelletiert und anschließend in 100 µl FACS Färbe-Puffer resuspendiert. Es wurden nun pro Tube je 0,5 µl je Antikörper hinzugefügt und kurz gevortext. Die Inkubationszeit für Oberflächenfärbung betrug 30 Minuten bei 8 °C. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal in FACS Färbepuffer gewaschen, um überschüssige Ak zu entfernen und den Färbevorgang zu stoppen.

3.2.3.1.4 ROS Färbung

Bei der ROS-Färbung handelt es sich um eine Methode mit der reaktive Sauerstoffradikale nachgewiesen werden können. Das Prinzip beruht auf einem Fluorescein-Esterderivat, das als Reduktionsmittel dient. Das Ausgangsmolekül besitzt ein schmales Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei circa 250 nm. Es liegt damit außerhalb der Anregungsfrequenz des FACS-Lasers für den FITC Kanal (488 nm). Der Farbstoff gelangt durch Diffusion in die Zelle und wird dort durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Mit der Abspaltung der Estergruppe steigt der Oktanol/Wasser Verteilungskoeffizient, und der Farbstoff kann nicht mehr so leicht aus der Zelle herausdiffundieren. Der nun intrazellulär "gefangene" Farbstoff kann durch reaktive Sauerstoffradikale, wie beispielsweise OH^- , H_2O_2 , HO etc., oxidiert werden. Durch diese chemische Modifikation bildet sich der messbare Farbstoff aus (siehe Abbildung 5), indem sich das Absorptionsmaximum von 250 nm auf ca. 490 nm verschiebt (INVITROGEN 2006). Das Emissionsmaximum liegt nun bei 530 nm. Es kann mit einem Durchflusszytometer in FITC Konfiguration detektiert werden.

Bei der ROS Färbung wurde das zu untersuchende Organ zunächst in eine Einzelzellsuspension aufgebrochen. Die Zellen wurden in T-Zell Medium aufgenommen und entsprechend den Einzelfärbungen auf FACS Tubes verteilt. Es wurde nun CM- H_2DCFDA in einer Endkonzentration

von 2,5 μM zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 36 °C im Brutschrank. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und anschließend mit Ak gegen Oberflächenproteine, wie oben beschrieben, weiter gefärbt.

Ein Störfaktor dieser Methode liegt in der extrazellulären Oxidation des Farbstoffes. Dies führt zu einem Anstieg des Hintergrundsignals und verschlechtert damit die Diskriminationsmöglichkeit zwischen Positiv- und Negativsignal. Dies wurde zum einen dadurch vermindert, dass der Farbstoff immer frisch angesetzt und dann sofort für die Färbung eingesetzt wurde. Zum anderen wurde der Farbstoff außerhalb der eigentlichen Zellfärbung auf Eis und unter Ausschluss von direktem Licht verarbeitet. Zudem galt es Zellstress zu vermeiden um kein falsch positives Signal zu erzeugen. Aus diesem Grund wurde die Färbung in normalem T-Zellmedium durchgeführt, da die Inkubation in PBS über Hungerstress zur Bildung von Sauerstoffradikalen führte. Ein weiteres Problem stellte die extrazelluläre Spaltung der Estergruppe des ROS Farbstoffes dar. Normalerweise liegt der Farbstoff extrazellulär verestert vor. Hierdurch ist dieser lipophil und kann die Zellmembran passieren. Intrazellulär werden dann durch Esterasen diese Gruppen abgespaltet, der Farbstoff wird hydrophiler und ist in der Zelle gefangen, da eine Membranpassage nicht mehr möglich ist. Bei einer extrazellulären Abspaltung der Esterasen verliert der Farbstoff zu früh die lipophilen Eigenschaften und kann nicht mehr in die Zelle eindringen, was zu einem niedrigeren Signal bei der Messung führt. FCS enthält zwar Esterasen, aber auf dessen Zugabe wurde trotzdem nicht verzichtet, um Zellstress zu minimieren. Die Signalstärke stellte unter diesen Bedingungen kein Problem dar.

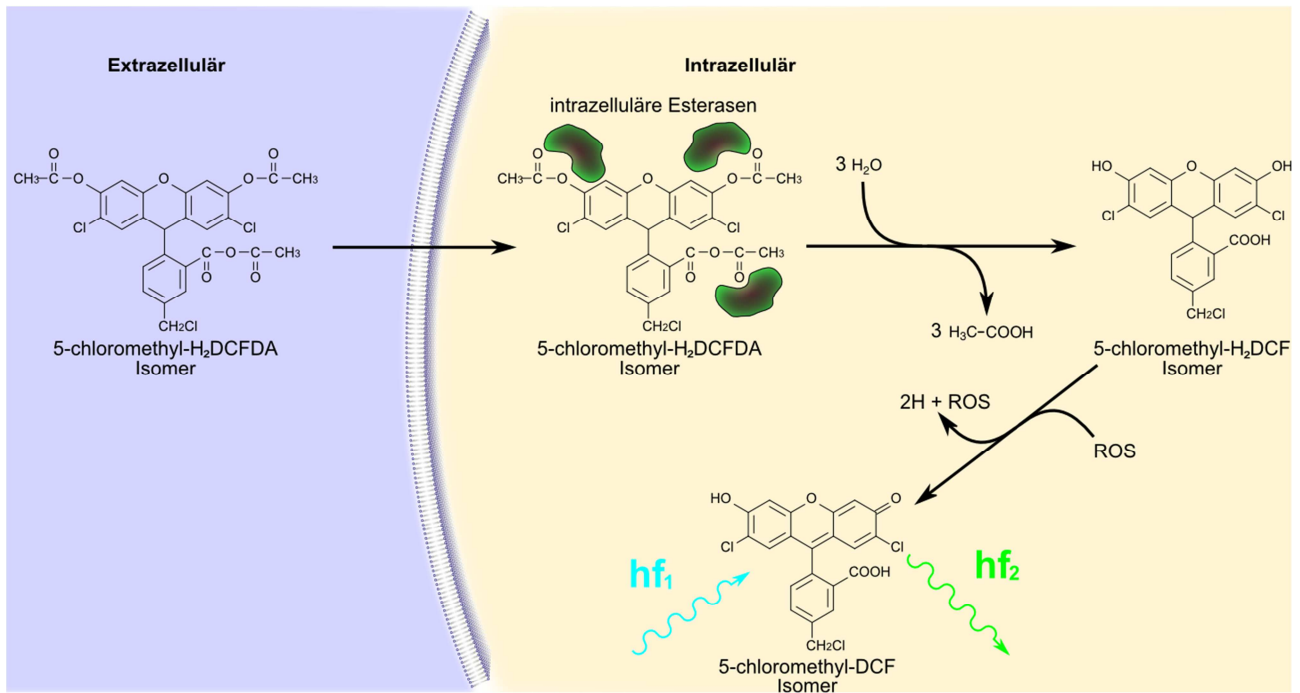


Abbildung 5: Schema der 5-chloromethyl-H₂DCFDA-Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS): Der Farbstoff diffundiert passiv in die Zelle. Intrazellulär wird er durch Esterasen gespalten und „gefangen“, da die Estergruppen für die Diffusion über die Membran notwendig sind. Im dritten Schritt aktivieren ROS den Farbstoff und bewirken hierbei eine Verschiebung der Absorptionsspektren.

3.2.3.1.5 Topro-3 Färbung

Mit dieser Methode können spätapoptotische Zellen angefärbt werden. Topro-3 ist ein Farbstoff der Cyanin-Familie, der eine intakte Zellmembran nicht überwinden kann. Bei spätapoptotischen Zellen verliert diese ihre Integrität. Sie wird für den Farbstoff permeabel und die DNA im Zellkern kann so durch Topro-3 angefärbt werden. Die Topro-3 Färbung wurde erst ca. 1 Minuten vor der FACS Analyse durchgeführt, da der Farbstoff selbst toxisch ist und eine zu lange Färbepériode das Ergebnis durch Apoptoseinduktion verfälschen würde.

3.2.3.1.6 Kompensationsfärbung

Für die Kompensationsfärbung wurden entweder Einzelfärbungen mit Zielzellen durchgeführt oder Kompensation-Beads verwendet. Die Oberflächen- und Toproeinzelfärbung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Bei der Verwendung von Antikörpern zur Oberflächenfärbung bestand eine weitere Möglichkeit für die Kompensation, die vor allem verwendet wurde wenn aufgrund experimenteller Bedingungen nur wenig Zellen zur Verfügung standen oder das Zielmolekül nur schwach exprimiert war. Dabei handelt es sich um Kompensation-Beads. Dies sind mit Anti-Ratte-Antikörper gecoatete Beads, an die FACS Antikörper gebunden werden können. Die Beads wurden

wie im Herstellungsprotokoll angegeben gefärbt. Pro Einzelfärbung wurden 10 µl je Beadsuspension verwendet. Nachteil dieser Beads war, dass sie im Gegensatz zu Zellen keine Eigenfluoreszenz besitzen.

Die ROS-Einzelfärbung wurde wie folgt durchgeführt: Splenozyten wurden in PBS und unter Zugabe von PMA (30ng/ml PBS) 30 Minuten bei 36 °C inkubiert. Durch den Stimulus und die Mangelbedingungen wurde ein starker Zellstress ausgelöst, der durch massive Radikalbildung ein stark positives Signal zur Folge hatte. Vor der Durchflusszytometrie wurden noch ungefärbte Zellen in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, damit eine negative und eine positive Population für die Kompensation zur Verfügung standen.

3.2.3.1.7 Fixierung von Zellen

Bei Experimenten, bei denen aus logistischen Gründen eine zügige durchflusszytometrische Analyse nicht möglich war, wurden die Proben fixiert. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um eine einheitliche Ausgangssituation für das Experiment zu erzielen. Die Fixierung wurde mit einer Formaldehydlösung durchgeführt, welche durch die Zugabe von Paraformaldehyd in Wasser hergestellt wurde. Unter Erhitzen zerfällt Paraformaldehyd zu Formaldehyd. Die Zellsuspension wurde mit dieser 2% Formaldehyd Stammlösung 1:1 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen im Kühlschrank aufbewahrt und schnellstmöglich untersucht. Die Formaldehydlösung bewirkt eine Denaturierung von Proteinen. Durch diesen Prozess wurden die Zell-Antikörper-Verbindungen fixiert und für längere Zeit stabilisiert. Ein Nachteil war, dass sich der FSC und der SSC veränderte, was einen direkten Vergleich mit anderen Experimenten erschwerte. Aus diesem Grund musste ein Experiment entweder komplett fixiert oder unfixiert durchgeführt werden. Weiter musste beachtet werden, dass eine Fixierung nicht bei allen Färbungen möglich war. Zum Beispiel musste bei der Verwendung von ROS Farbstoffen immer mit unfixierten Zellen gearbeitet werden, da eine Fixierung über die Bildung von Radikalen zwangsweise mit einer Aktivierung des Farbstoffes einhergegangen wäre. Topro Färbungen waren ebenso nur mit unfixierten Zellen möglich, da diese für die negative Population vitale Zellen voraussetzt.

3.2.3.1.8 Gating Strategie der MDSCs

Die MDSCs wurden während der Auswertung der FACS Analysen mittels folgender Gatingstrategie ermittelt (Abbildung 6). Nach Kompensation mittels Einzelfärbungen wurde zunächst über den FSC-SSC Plott ein Life-Gate gewählt um tote Zellen und kleine Partikel auszuschließen. Dieses Lifegate wurde einmalig mit einer Topro-3 Färbung ermittelt. Anschließend wurden die gesamte MDSCs über die Oberflächenmarker CD11b⁺ GR1⁺ selektiert. Dieses Subgate wurde anschließend

in einem Ly6C-Ly6G Plott dargestellt um die PMN- und MO- MDSCs Populationen auf zu trennen. Diese wurden dann z. B. mittels Histogramm Analysen auf Aktivitätsmarker weiter untersucht.

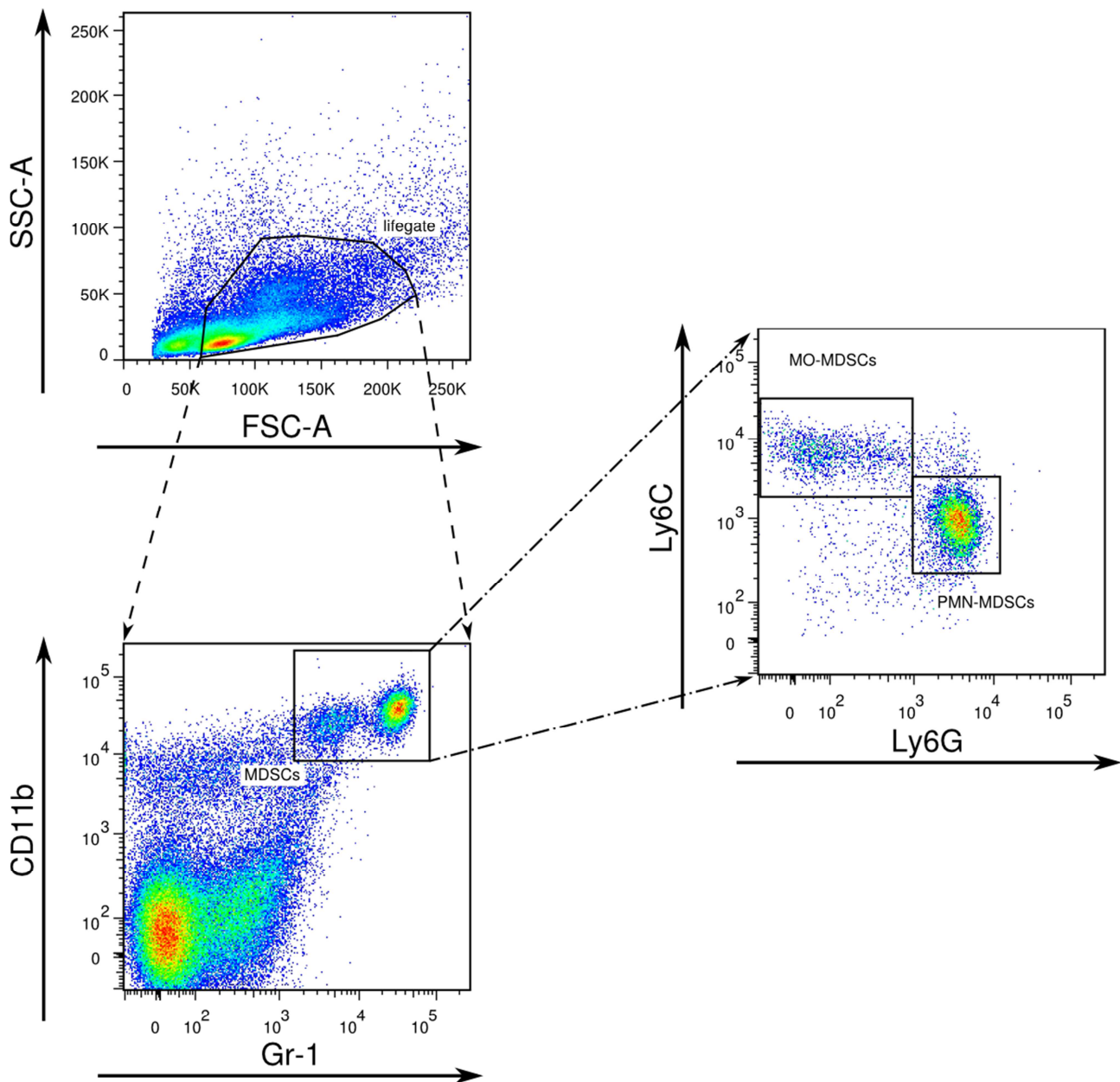


Abbildung 6: Graphische Darstellung eines exemplarischen Experiments um eine Subgruppenanalyse des MDSCs durchzuführen. Es wurde zunächst mit einem Lifegate tote Partikel und Zellbruchstücke im FSC-SSC Blot ausgeschlossen. Anschließend wurden die MDSCs als GR-1/CD11b doppel-positive Zellen selektiert. Die MDSCs wurden daraufhin über die Oberflächenmarker Ly6G und Ly6C in die MDSCs Subgruppen PMN- und MO-MDSCs unterteilt.

3.2.3.2 ELISA

ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) ist eine Methode, mit der spezifische polyvalente Antigene (in der Regel Proteine) quantitativ nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche ELISA-Sets von BD verwendet. Der Primärantikörper (oder auch *capture antibody*) wurde in *coating*-Puffer verdünnt und über Nacht an eine hochadhäsive 96-well

Mikrotiterplatte gebunden. Die Inkubationstemperatur betrug 4 °C. Je nach ELISA-Set wurden den Vorgaben des Herstellers entsprechend verschiedene *coating*-Puffer verwendet. Der Primärantikörper wurde entfernt und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die übrig gebliebenen Bindungsstellen an der Mikrotiterplatte mit *Assay Diluent* abgedeckt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, sodass die unspezifische Bindung von Proteinen vermindert wurde. Nach diesem sogenannten Blockierungsschritt wurde die Mikrotiterplatte wiederum dreimal mit Waschpuffer gespült und die Wells mit den Proben, meist Zellkulturüberständen, und dem Standard bestückt. Die nachfolgende Inkubationszeit von zwei Stunden war nötig, um das Zielprotein an den Primärantikörper zu binden. Nach diesem Schritt wurde die Platte fünf Mal gewaschen und die Mikrotiterplatte für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert. An diesen Antikörper wurde in dem gleichen Schritt über eine Streptavidin-Biotin Verbindung eine Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden. Anschließend wurden die Wells sieben Mal gewaschen und mit Substrat aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid gefüllt. Die Reaktion wurde mit zweinormaler Schwefelsäure abgestoppt, wenn die ersten vier Standards sichtbar wurden. Das Auslesen erfolgte bei 450 nm im Mithras Reader, die Datenanalyse mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogramms, das die Standardkurve abschnittsweise analysierte und entsprechend in der Auswertung berücksichtigte.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RT-PCR

Die RT-PCR (real-time PCR) ist eine Methode mit der DNA und indirekt RNA oder mRNA quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden können. Das Prinzip beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion. In diesem speziellen Fall definieren zwei flankierende Primer ein kurzes Stück cDNA, das während der RT-PCR amplifiziert wird. Innerhalb dieses sequenzierten Teils bindet eine Sonde aus sogenannter „*locked nucleic acid*“. Hierbei handelt es sich um einer speziellen Art von RNA, bei der die Konformationsisomerie durch Einfügen eine Ethergruppe zwischen dem 2' und 4' Kohlenstoffatoms des Riboseringes festgelegt ist (siehe Abbildung 7).

Durch diese Änderung wird die Schmelztemperatur eines Nukleinsäurehybrids stark erhöht, was ein sehr kurzes Design der Sonde erlaubt. Die LNA Sonden arbeiten nach dem Prinzip des sogenannten „*fluorescence resonance energy transfer*“ (FRET). Dafür sind die Sonden mit zwei Fluorochromen (F1 und F2) ausgestattet, wobei das Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (F1) sich mit dem Absorptionsspektrum des zweiten (F2) überschneidet. Dadurch wird die Fluoreszenz des

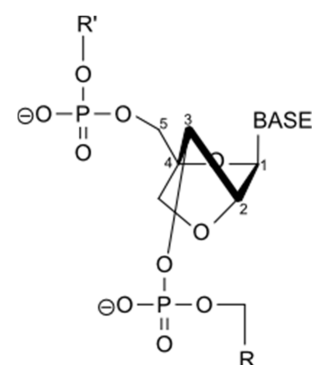


Abbildung 7: Strukturformel des Phosphat-Ribosederivat-Rückgrads der LNA

ersten Fluorochroms (F1) unterdrückt, da das emittierte Photon des ersten Fluorochroms (F1) vom zweiten (F2) direkt absorbiert wird (Abbildung 8a). Bei der Messung wird im Absorptionsspektrum des ersten Fluorochroms (hf_1) angeregt und im Emissionsspektrum von F1 (hf_2) gemessen. Diese Sonde wird während der Polymerasereaktion durch die 5'-3' Exonukleasefunktion der Polymerase abgebaut und so aktiviert. Da die Fluorochrome F1 und F2 sich nun nicht mehr in sterischer Nähe befinden und sich nicht mehr gegenseitig beeinflussen können, wird das Emissionsspektrum von F1 (hf_2) nicht mehr von F2 absorbiert und wird somit messbar. Die gemessene Fluoreszenz des ersten Fluorochroms nimmt idealerweise linear zur Anzahl der produzierten Kopien zu (Abbildung 8b).

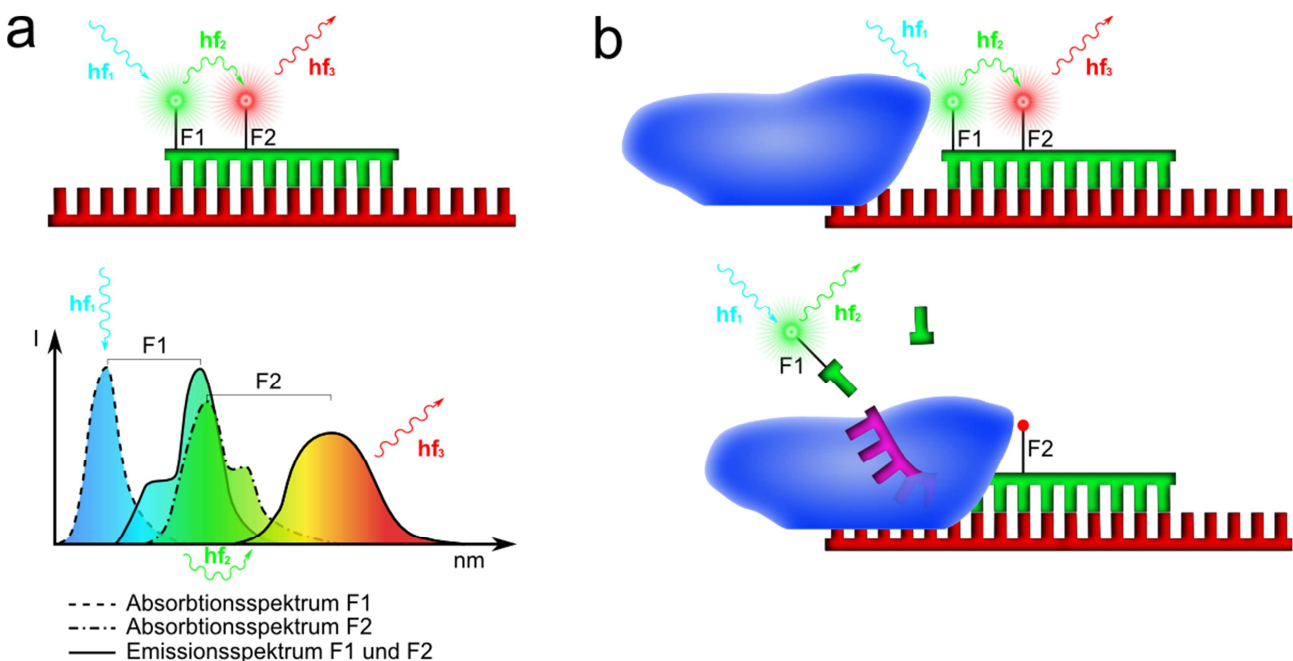


Abbildung 8: a) Prinzip des FRET: hf_1 Photon mit einer Anregungsfrequenz von F1, hf_2 von F1 emittiertes Photon das von F2 absorbiert wird, hf_3 von F2 emittiertes Photon; unten: Schema der Spektrenverteilung zweier hypothetischer Farbstoffe F1 und F2; b) Aktivierung der LNA Sonde durch die Polymerase

3.2.4.1.1 RNA Isolation

Für die Isolation der mRNA wurden prinzipiell zwei Wege gewählt. Anfangs (vor allem während der Methodenetablierung) wurde die mRNA mit Hilfe des „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche isoliert. Dabei wurde zunächst die zu untersuchende Einzelzellsuspensionen (max. 10^6 Zellen) in 200 μ l PBS eingestellt. Die Zellen wurden anschließend mit 400 μ l „Lysis/-Bindingbuffer“ unter Vortexen lysiert. Die Lösung wurde dann über eine Aufreinigungssäule zentrifugiert. Die DNA in der Filtersäule wurde anschließend mit 10 μ l DNase (18000U/ml) in 90 μ l „DNase-Incubation Buffer“ 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Nach dem Hydrolyseschritt wurde die Säule einmal mit „Wash Buffer I“ (500 μ l) und zweimal mit „Wash

Buffer II“ (500 µl + 200 µl) gewaschen. Zuletzt wurde die RNA mit 50 µl H₂O eluiert. Dieses Verfahren wurde für die Gewinnung von RNA aus MDSCs verworfen, da die Ausbeute zu gering war und für die weitere Verarbeitung keine derart hohe Reinheit erforderlich war.

Die zweite Methode, mit der eine ausreichende Ausbeute an RNA erzielt werden konnte, war die Fällung mittels Trizol®. Dabei wurden die Zellen (max. 10⁷) zunächst durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand vollständig mit einer Pipette entfernt. In manchen Fällen wurden diese Zellpellets aus logistischen Gründen bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde mit einem Milliliter Trizol® resuspendiert. Bei gefrorenen Pellets wurde das Trizol® auf das noch gefrorene Pellet pipettiert. Mit diesem ersten Schritt wurden zum einen die Zellen lysiert und zum anderen RNase-Aktivitäten unterbunden (Diese Lösung konnte, falls notwendig, ebenfalls bei -80 °C eingefroren werden). Die lysierten Zellen wurden nun zehn Minuten bei 12.000g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand anschließend bei RT inkubiert. Nach fünf Minuten wurden 200 µl Chloroform zugegeben, für 15 Sekunden per Hand geschüttelt und anschließend weitere 3 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde für weitere 15 Minuten bei 12.000g und 4 °C zentrifugiert. Die obere durchsichtige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol für zehn Minuten bei RT inkubiert. Die untere Phase wurde verworfen. Nach der Inkubation wurde ein weiteres Mal zehn Minuten lang bei 12.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA ein weiteres Mal mit einem Milliliter 75% Ethanol gewaschen und fünf Minuten bei 7.500g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet ca. zehn Minuten bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 40 µl H₂O aufgenommen und für 10 Minuten bei 55-60 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4.1.2 cDNA -Synthese

Für die real-time PCR ist zunächst eine Umschreibung der RNA in DNA notwendig. In diesen Fall wurde generell ein Oligo dT-Primer verwendet um ausschließlich mRNA in DNA umzuschreiben und somit eine cDNA Bank zu bekommen. Es standen zwei gleichwertige Verfahren zur Verfügung. Zum einen ein fertiger Roche Kit „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ und zum anderen Einzelkomponenten von der Firma Fermentas. Das Prinzip war in beiden Fällen identisch. Zunächst wurde die RNA mit dem Oligo dT Primer bei 65 °C mit anschließender Eiskühlung hybridisiert. Daraufhin wurden dieser Lösung der Puffer, RNase-Inhibitor, dNTPs und reverse Transkriptase zugegeben und bei 45 °C für 30-60 Minuten inkubiert. Am Ende wurden die Enzyme bei 85-95 °C für fünf Minuten hitzeinaktiviert und auf Eis gelagert bzw. eingefroren.

3.2.4.1.3 Realtime Polymerase Kettenreaktion (rt-PCR)

Die eigentliche rt-PCR wurde mit Hilfe eines LightCyclers 480 von Roche durchgeführt. Die Reaktion fand in 96-Well Platten statt. In jedes Well wurden zunächst eine Fast Start Taq Polymerase, die LNA Sonde und die Primer zugegeben. Abschließend wurde die Probe hinzugefügt. Die 96-Well Platte wurde mit einer durchsichtigen selbstklebenden Folie luftdicht verschlossen, um ein Verdampfen der Probe während des PCR Vorgangs zu verhindern. Luftblasen in den Wells wurden durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 1500g entfernt. Anschließend wurde die Platte nach Inspektion in den LightCycler geladen. Ein PCR Zyklus bestand aus einer primären 10 Minuten dauernden Vorinkubation bei 95 °C. Grund hierfür war die Verwendung der FastStart Taq Polymerase. Diese ist zunächst durch monoklonale Antikörper inaktiviert, die eine Polymeraseaktivität unterhalb von 75 °C verhindern. Durch die Vorinkubation bei 95 °C denaturieren die Antikörper selektiv und die Taq-Polymerase wird freigegeben (KELLOGG *ET AL.* 1994). Dieser Aktivierungsphase folgte ein normaler PCR Zyklus, bei dem die Primer Annealing- und Polymerisationstemperatur bei 60 °C lag (30 Sek.). Die zyklische Schmelztemperatur lag bei 95 °C für 10 Sek. Nach circa 40 Zyklen erfolgte eine Abkühlphase auf 40 °C. Jeder Zyklus beinhaltete eine Messung der Fluoreszenz der Proben. Hier wurde anschließend durch eine Software der sogenannte CP (engl. *Crossing Point*“) ermittelt. Dies erfolgte mit Hilfe der zweiten Ableitung der Fluoreszenzkurve, die die Fluoreszenz der einzelnen PCR-Zyklen darstellte. Der CP stellt den Übergang von der exponentiellen zur linearen Produktanhäufung in der RT-PCR dar. Es ist der Punkt an dem die PCR gerade noch im optimalen Bereich verläuft. Diese Methode wurde anderen Methoden zur CP Bestimmung, wie zum Beispiel einem fixen Fluoreszenzniveau, vorgezogen, da sie immer das Ende des exponentiellen Bereichs der PCR erfasst und somit unabhängiger vom Niveau und Steilheit der Kurven ist (Abbildung 9).

3.2.4.1.4 Auswahl der Primer und *housekeeping*-Gene

Die Primer-Probe Kombinationen wurde mit Hilfe der Universal *ProbeLibrary* von Roche Applied Science erstellt. Die Primer wurden anschließend bei Metabion GmbH bestellt. Die Primerpaare wurden generell mit dem sogenannten „*Exon-Skipping*“-Verfahren konstruiert. Das heißt, dass zwischen dem *forward* und *backward* Primer ein Intron liegt, die Primerpaare also in zwei verschiedenen Exons zu liegen kommen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine mögliche DNA-Kontamination vom Zellkern weniger leicht ein falsch positives Ergebnis liefert, da die Polymerase zusätzlich das komplette Intron replizieren müsste, bevor sie ein komplettes PCR Produkt liefern könnte. Dies wird in der Regel nicht bewerkstelligt, da die Polymerase zum einen im Mittel nach 1000 Basenpaaren (BP) abfällt und zum anderen die Elongationsphase durch einen schnellen PCR-Zyklus kürzer als die Replikationsdauer einer Intronlänge gehalten wurde. Die

Folge ist, dass entweder gar kein Produkt und somit keine Fluoreszenz-Probe gespalten wird oder pro Zyklus nur eine Richtung synthetisiert wird und somit nur eine lineare Produktanhäufung zustande kommt. Da ein PCR-Produkt erst ab ca. 10^{11} Kopien nachweisbar wird, kann dieses vernachlässigt werden. Trotzdem wurde zur Sicherheit bei jeder PCR eine RNA-Probe mit getestet um den seltenen Fall eines kurzen Introns oder einer Kontamination auszuschließen. Darüber hinaus wurde immer eine Negativprobe mit H_2O und bei niedriger Expression eine Positivprobe zur Qualitätssicherung mituntersucht.

Jede Primer-Probe Kombination wurde anhand von cDNA, die aus Splenozyten gewonnen wurde, getestet. Es wurden im Vorfeld die cDNA von Splenozyten und MDSCs verglichen. Dabei wurde kein Unterschied in der Effizienz festgestellt. Hierbei bezeichnet die Effizienz die Menge, um die sich ein PCR Produkt pro PCR Zyklus vermehrt. Theoretisch beträgt die Effizienz immer zwei. Das heißt, das PCR Produkt verdoppelt sich bei jedem Zyklus. In der Realität nähert sich die Effizienz nur dem Faktor zwei, da Polymerasen oft vor Beendigung der kompletten DNA Synthese abfallen oder der Primer zu schwach an die Zielstruktur bindet. Dies führt dazu, dass eine stöchiometrische Umsetzung nicht mehr möglich und die Effizienz kleiner als zwei wird. Vernachlässigt man eine abweichende Effizienz in verschiedenen Proben, bekommt man einen systematischen Fehler der sich von Zyklus zu Zyklus potenziert. Die Effizienz der PCR wurde Anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt. Hierbei zeigte sich die Effizienz als Steigung der Geraden, die die einzelnen CPs der Verdünnungsreihe in der logarithmischen Darstellung schnitt. Diese Methode wurde gewählt da sie, im Gegensatz zu Steigungsanalysen der Fluoreszenz der Einzelkurven, zu den genaueren und stabileren Methoden zählt. Die Effizienz wurde in dieser Arbeit vor allem ermittelt um die Qualität des Primer-Probe Paares zu ermitteln. Ein Vergleich der Expression in den Subpopulationen der MDSCs zeigte keinen Effizienzunterschied. Effizienzen alterieren vornehmlich aufgrund unterschiedlicher Konzentrationen von Fettsäuren und Ionen. Diese beeinflussen die Bindungswahrscheinlichkeit des Primers und somit dessen Effizienz. Da die MDSC Subpopulationen beide aus der gleichen Milz gewonnen wurden, unterschied sich das Ausgangsgewebe nicht bezüglich Fettsäuren und Ionenkonzentrationen. Dies war wohl der Hauptgrund dafür, dass sich die Effizienzen in den Subpopulation nicht unterschieden. Als *housekeeping*-Gene wurden mehrere Gene untersucht, die bekanntermaßen eine stabile Expression in murinen Splenozyten aufweisen. Von den zahlreichen Genen, die untersucht wurden, wurden folgende *housekeeping*-Gene ausgewählt:

SDHA (Succinatdehydrogenase A), HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) und HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthase).

Diese drei *housekeeping*-Gene zeichneten sich zum einen dadurch aus, dass sie in ihrer Expression im Bereich der Zielgene lagen. Darüber hinaus zeigten sie eine ähnlich hohe Expression in DCs und MDSCs. Des Weiteren zeigten die *housekeeping*-Gene eine sehr ähnliche relative Expression in den MDSCs (Abbildung 9). Die Differenz der auf HMBS bezogenen CP Werte lag im Bereich der Messgenauigkeit der Methode.

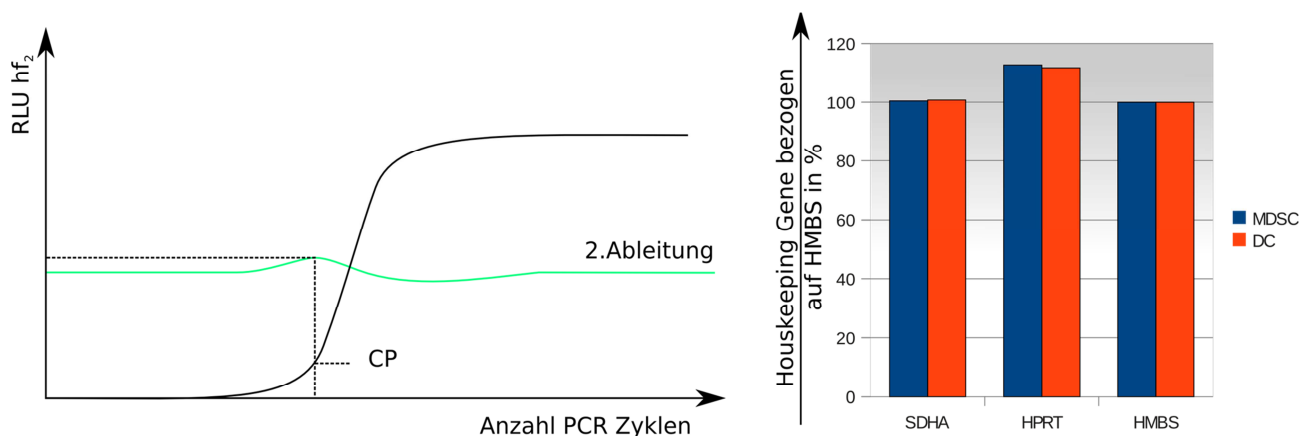


Abbildung 9:links: CP Ermittlung anhand der Methode der 2. Ableitung, schwarze Kurve fiktives Messergebnis einer RT-PCR, grün schematische 2. Ableitung der schwarzen Kurve. Die Zykluszahl des Maximums der zweiten Ableitung entspricht dem CP; rechts: CP Werte der housekeeping-Gene in MDSCs und DC bezogen auf HMBS

Dies war ein guter Hinweis darauf, dass diese Gene in den MDSCs relativ zu denen in den DCs nicht reguliert sind und somit als *housekeeping*-Gene geeignet waren. PPI (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase) wurde zum Beispiel verworfen, da dieses *housekeeping*-Gen keine stabile Expression aufwies. Zudem war diese in der Regel in MDSCs nur schwach bis gar nicht exprimiert. Es wurde generell das geometrische Mittel dieser drei *housekeeping*-Gene verwendet um eine etwaige Schwankung einzelner Gene zu kompensieren.

Als weitere Qualitätskontrolle wurde ein sogenannter Kalibrator verwendet. Dieser bestand aus einer aliquotierten cDNA Probe, die aus Splenozyten gewonnen wurde. Der Kalibrator wurde regelmäßig bei den Experimenten mitgemessen, zum einen um die Reproduzierbarkeit der Methode zu ermitteln und zum anderen um etwaige methodische Fehlerfaktoren aufzuspüren.

3.2.4.2 *BrdU-Wachstumsassay*

Das Funktionsprinzip des BrdU ähnelt dem vieler radioaktiver Wachstumsassays: Dem Medium wird eine bestimmte Menge der modifizierten Base BrdU zugegeben. Diese wird bei Zellteilungen in die DNA eingebaut. Anschließend wird das eingebaute BrdU durch einen spezifischen Antikörper

detektiert und mittels einer an den Ak gebundenen Peroxidase über eine Chemolumineszenzreaktion quantifiziert. Für diesen Assay wurde der „Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemoluminescent)“ Kit von Roche verwendet.

Zunächst wurden die Zellen, wie im Kapitel 3.2.2.5 beschrieben kultiviert. Allerdings wurden in diesem Fall weiße 96-Well Zellkulturplatten verwendet, um eine Einstrahlung in die Nachbarwells zu minimieren. Die Randwells wurden frei gelassen, da diese erfahrungsgemäß größere Abweichungen aufwiesen. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen weitere 12 Stunden mit BrdU (Endkonzentration 10 μ M BrdU) inkubiert. Nach Ablauf von 12 Stunden wurden die Überstände bei 400 m/s^2 für 7 Minuten abzentrifugiert und die Überstände mit einer Achtkanalpipette bis auf ca. 50 μ l abgenommen. Die Überstände wurden in eine neue 96-Wellplatte überführt und für weitere Versuche bei -20 °C gelagert. Nach dem Abnehmen wurden die Platten erneut zentrifugiert, um keine Zellen zu verlieren und die restlichen Überstände durch Dekantieren und Abtupfen auf Zellstoff entfernt. Die Platten wurden nun so lange mit einem Heißluftgebläse getrocknet, bis in jedem Well das Restmedium die Farbe von rot nach gelborange wechselte. Bei diesem Vorgang wurden die Zellen aufgebrochen, die DNA denaturiert und dadurch für die Detektion zugänglich gemacht. Die getrockneten Platten wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder im Kühlschrank bei 4 °C für max. 5 Tage zwischengelagert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit FixDenat (100 μ l/Well) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierungslösung wurde durch Dekantieren und vorsichtiges Abklopfen entfernt. Es folgte nun eine Inkubation mit 50 μ l Anti -BrdU-POD-Ak Lösung für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Dieser Ak ist mit einer Peroxidase gekoppelt, über die die Chemolumineszenzreaktion katalysiert wird. Die nicht gebundenen Ak wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Substratlösung (vermutlich H_2O_2 und Luminol) in die Wells pipettiert. Der Readout erfolgte nach drei Minuten im Mithras Plattenlesegerät durch Chemolumineszenz Messung. Das Prinzip ist in Abbildung 10 dargestellt.

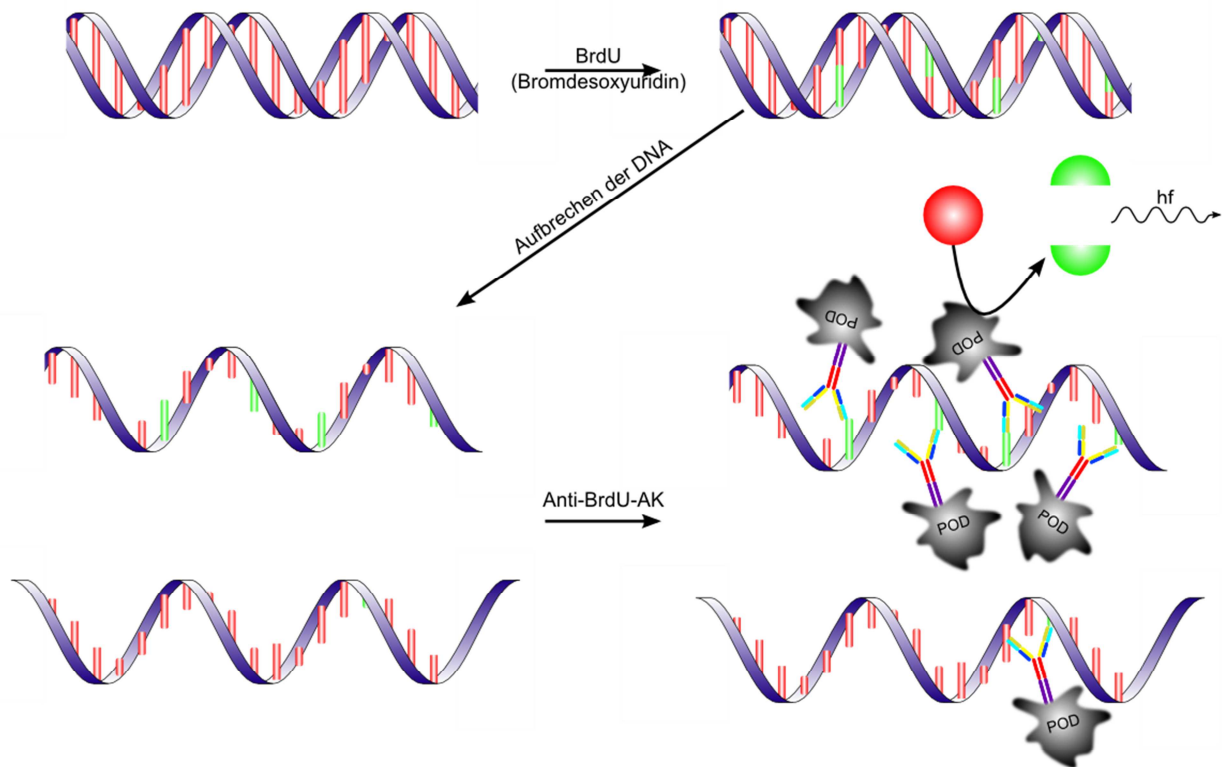


Abbildung 10: Prinzip des BrdU-Assay: Im ersten Schritt wurde BrdU zu der Zellkultur zugegeben. Dieses wurde von den Zellen bei der Replikation in die DNA eingebaut. Anschließend wurde die DNA aufgebrochen und Antikörper gegen BrdU an die DNA gebunden. Diese Antikörper waren an eine Peroxidase gebunden, die nun ein Substrat unter Lichtabgabe spalten konnte. Die emittierte Lichtmenge korreliert mit dem Grad des eingebauten BrdU, also den Grad der Zellteilung.

3.2.5 Statistische Methoden

Zur Auswertung wurde Excel von Microsoft verwendet. Die Signifikanzanalysen wurden mittels Students T-test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen und die Nullhypothese verworfen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Generell wurden nur biologisch repräsentative Variablen gewählt. Es wurden also bei in vivo Experimenten die Messergebnisse der einzelnen Mäuse verglichen. Bei in vitro Experimenten wurden immer die einzelnen Bedingungen miteinander verglichen. Triplekate von ELISA Analysen o.ä. flossen in keine Statistik oder Standardabweichung ein, da die Reproduzierbarkeit der einzelnen Experimente repräsentiert werden sollte und nicht die Reproduzierbarkeit der Methode.

4 Ergebnisse

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem SV40 Tumormodell und seinen korrespondierenden Zelllinien. Einige Experimente wurden in mehreren Modellen bearbeitet um Querschlüsse ziehen und Unterschiede zwischen den einzelnen Tiermodellen herausarbeiten zu können. Methoden-etablierungen wurden dahingegen nur in einem Tiermodell durchgeführt, um nicht mehr Versuchstiere als notwendig opfern zu müssen.

4.1 MDSCs im SV40-Modell und in korrespondierenden Tumormodellen

4.1.1 Expansion der MDSCs

In der Einleitung wurde schon darauf hingewiesen, dass MDSCs unter verschiedenen entzündlichen Bedingungen expandieren. Es ist schon seit längerem bekannt, dass bei neoplastischen Erkrankungen das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt und Entzündungsreaktionen beteiligt sind (BALKWILL & MANTOVANI 2001). Auch unter diesen Umständen expandieren die MDSCs. In den in dieser Arbeit verwendeten Tumormodellen zeigte sich je nach Tumorstadium ein deutlicher Anstieg der MDSC-Fraktion in der Milz. Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Expansion von MDSCs in der Milz in SV40 Mäusen. Es wurden sieben tumorfreie Wildtyp (WT) Mäuse mit 14 SV40 Mäusen verglichen. Die SV40 Mäuse waren ca. 105 Tage alt. Zu sehen ist ein signifikanter prozentualer Anstieg der MDSC Population im Lifegate von isolierten Splenozyten bei den SV40 tumortragenden Mäusen.

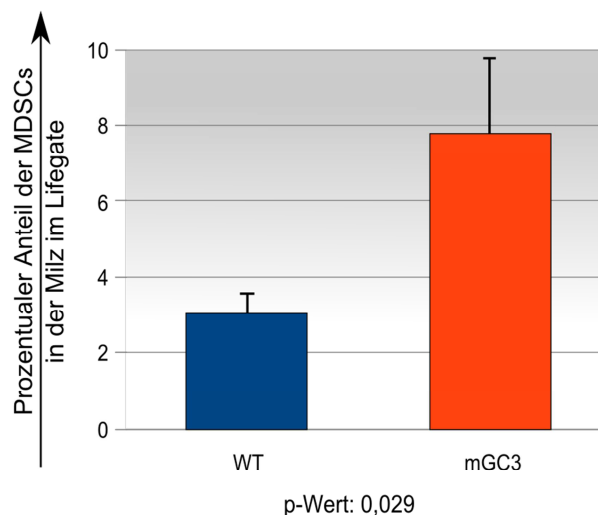


Abbildung 11: Anteil der MDSCs im mGC-3 Tumormodell

(WT: n=4, mGC-3: n=4)

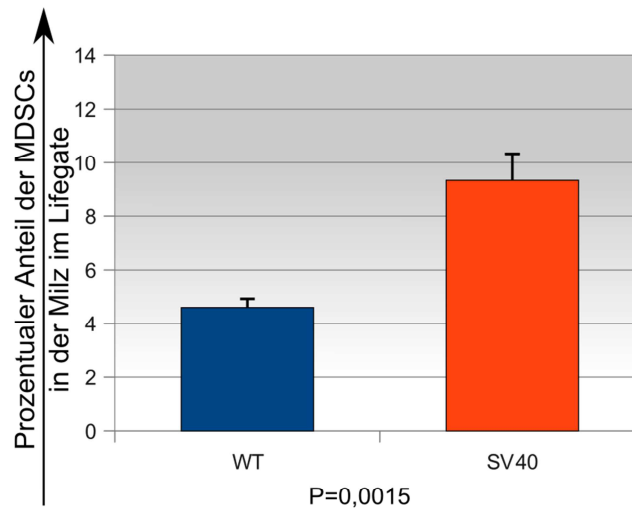


Abbildung 12: Expansion der MDSCs in SV40 tumortragenden Mäusen

(WT: n=7, SV40 n=14)

Bei den Experimenten mit *mGC-3* und *mGC-8* tumortragenden Mäusen wurde im Rahmen der Qualitätskontrolle der Aufreinigung die gepolten Gruppen als Ausgangswert für den Aufreinigungsprozess durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich durchwegs bei allen tumortragenden Mäusen im Vergleich zu den nicht- tumortragenden Mäusen ab einem gewissen Tumorstadium ein Anstieg der MDSCs. Abbildung 11 zeigt exemplarisch den MDSC-Anteil in der Milz von Mäusen mit einem s.c. *mGC-3* Tumor. Die absolute Anzahl der MDSCs, zeigte bei den *mGC-3* tumortragenden Mäusen einen signifikanten Unterschied zu tumorfreien (s.o.) Mäusen (Mittelwert WT:3,0 zu *mGC-3*:7,8; $p=0,029$). Bei den *mGC-8* Experimenten war die Anzahl Experimente zu klein, um eine statistische Aussage treffen zu können. Aber auch hier zeigte sich ein Trend zu einer Expansion der MDSCs. Bei den Subpopulationen an sich waren die PMN-MDSCs signifikant stärker vertreten. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Experiment, dass das Verhältnis der MDSC-Subpopulationen in der Milz in SV 40 Mäusen darstellt. Das Verhältnis der Subpopulationen der MDSCs, die aus SV40 tumortragenden Mäusen stammten, zeigte im Vergleich zu den MDSCs aus WT Mäusen keinen signifikanten Unterschied. MDSCs zeigten somit in unserem Tumormodell eine Expansion der Population. Das Verhältnis der Subpopulationen war jedoch davon unberührt.

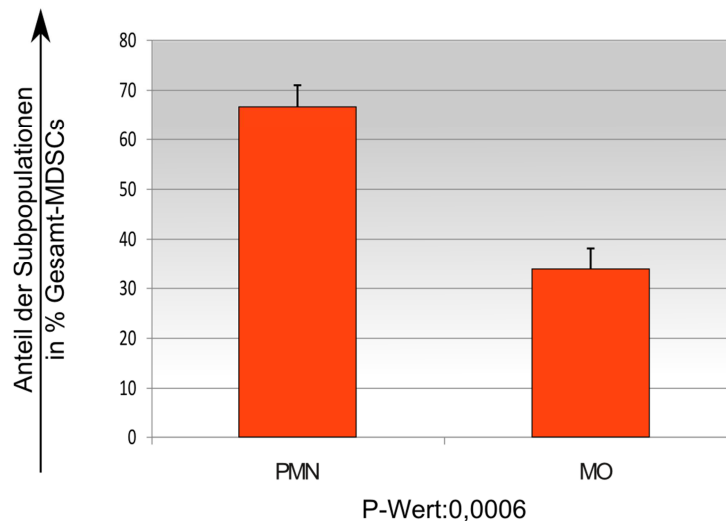


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Subpopulationen der MDSCs in der Milz in SV 40 Mäusen

(SV40 Mäuse n=7)

4.1.2 Inhibitorischer Effekt der MDSCs

Die MDSCs sind in der Maus als heterogene Zellgruppe über GR1+ und CD11b+ definiert. Eine essentielle Eigenschaft, die die MDSCs auszeichnet, ist die Fähigkeit andere Effektorzellen wie zum Beispiel T-Zellen *in vitro* in ihrer Funktion zu hemmen. Eine wesentliche Funktion von Immunzellen ist die Proliferation als Reaktion auf einen adäquaten Stimulus. Dies ist für Immunzellen wie T-Zellen unabdinglich, um auf einen Stimulus wie eine Infektion oder eine Tumorerkrankung adäquat reagieren zu können. Diese Proliferation wurde in dieser Dissertation mit Hilfe des BrdU-Assays (siehe 3.2.4.2) ermittelt. Dazu wurden Zellen aus gesunden Mäusen (T-Zellen oder Splenozyten, hier als Responderzellen bezeichnet) in verschiedenen Verhältnissen mit aufgereinigten MDSCs aus tumortragenden Mäusen kokultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen weitere 12 Stunden mit BrdU kultiviert. Anschließend wurde der Readout vorgenommen. Als adäquater Stimulus für die Responderzellen dienten hier Beads, die mit Anti - CD3/CD28 Antikörpern beschichtet waren, und somit antigenpräsentierende Zellen imitierten. Diese hatten den Vorteil, dass man eine reproduzierbare Aktivierung erzielen konnte. Abbildung 14 zeigt den prinzipiellen Aufbau der Experimente.

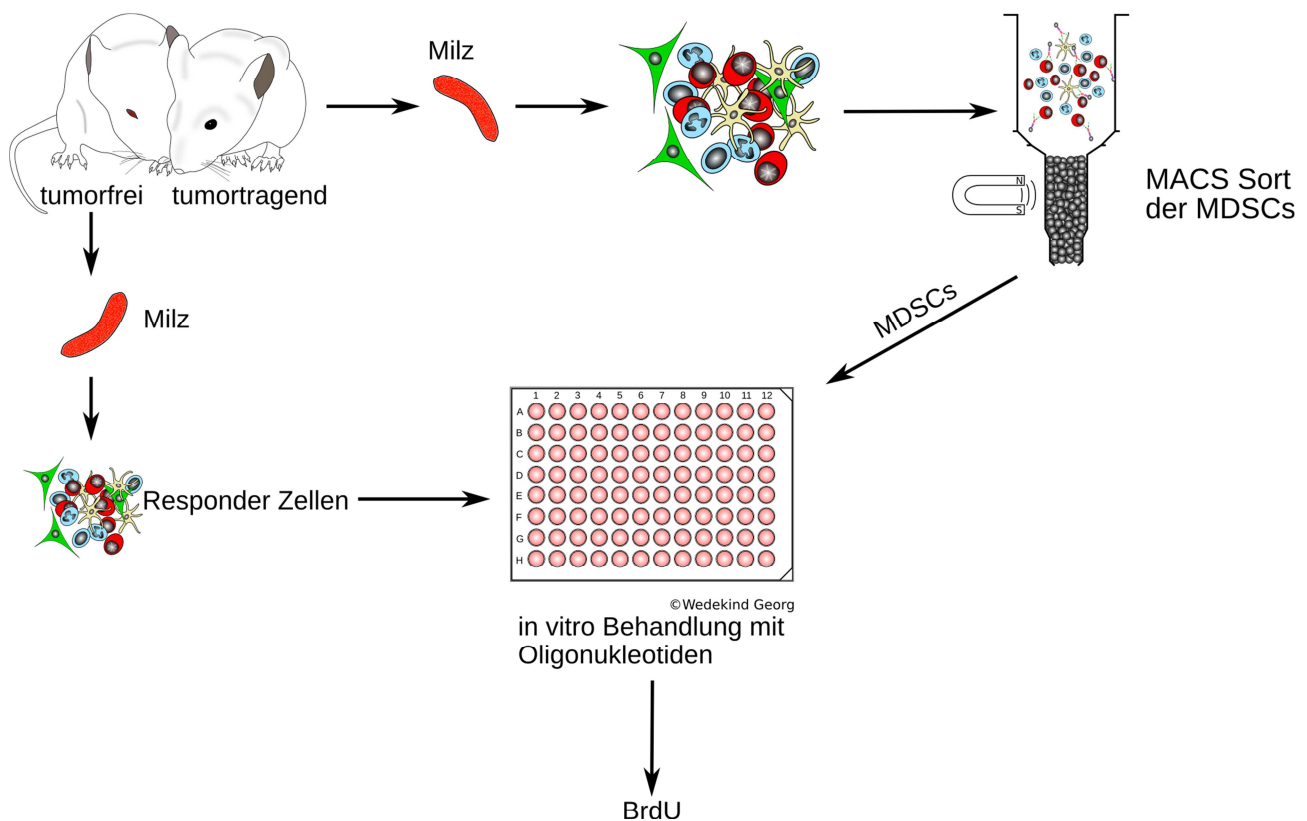


Abbildung 14: Aufbau der Inhibitionsversuche

Es wurden MDSCs aus verschiedenen Tumormodellen hinsichtlich ihrer Suppressivität untersucht. Es ist im Folgenden immer die relative Proliferation d.h. relativ zur ungehemmten Proliferation der Responderzellen dargestellt.

4.1.2.1 Effekt auf die Proliferation durch MACS-gesortete MDSCs

Abbildung 15 zeigt, wie sich die Kokultivierung von MDSCs mit T-Zellen auf die Gesamtproliferation auswirkt. Des Weiteren stellt die Abbildung die Spontanproliferation von unstimulierten T-Zellen als Referenz dar. Man sieht, dass die PMN-MDSCs bei einem T-Zell: MDSC Verhältnis von 1:1 die Proliferation praktisch aufheben. Mit abnehmendem MDSC-Anteil nimmt die Proliferation wieder zu. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Inhibition direkt von den PMN-MDSCs abhängt. Bei den MO-MDSCs zeigt sich ein sehr ähnlicher Effekt. Der einzige Unterschied in diesem Experiment war, dass die Inhibition nicht so stark ausgeprägt war wie bei den PMN-MDSCs. Dies war ein reproduzierbares Phänomen, das in den Inhibitions-Experimenten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.

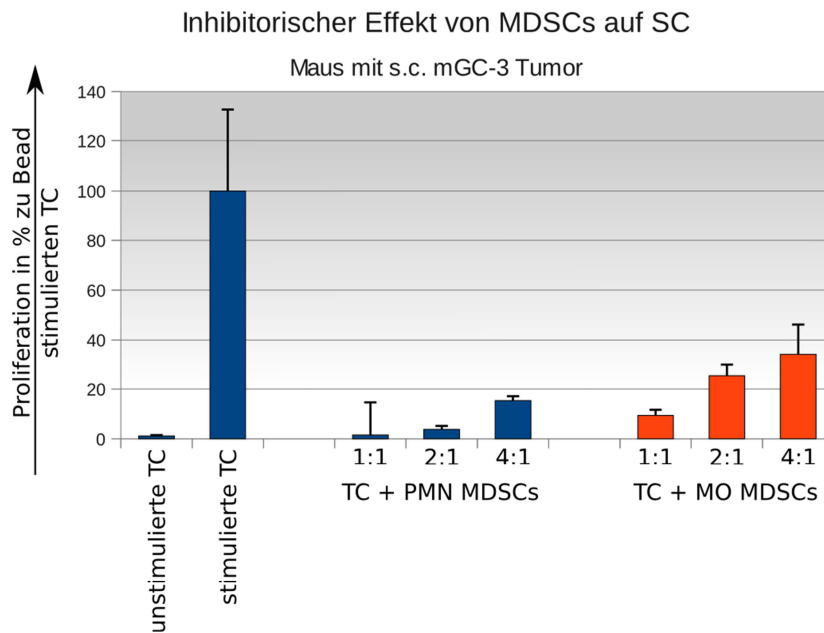


Abbildung 15: Inhibitorischer Effekt von MDSCs auf T-Zellen. Die T-Zellen stammten aus der Milz einer gesunden Spender-Maus. Die MDSCs aus der Milz einer mGC-3 Tumormaus

(Daten repräsentativ für drei Experimente)

Ein ähnliches Bild zeigt sich in Abbildung 16. Hier wurde als einziger Unterschied die Art der Responderzellen geändert. In diesem Fall handelte es sich nicht um T-Zellen, sondern um Splenozyten. Auch hier zeigt sich eine deutliche Reduktion der Proliferation. Die maximale Hemmung der Proliferation ist allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei den T-Zellen. Dies könnte an dem anderen Responderzell- T-Zellverhältnis liegen. Dieser Effekt war allerdings in den meisten Experimenten in unterschiedlicher Ausprägung reproduzierbar. Auch sieht man hier wieder das Phänomen, dass PMN-MDSCs stärker hemmen als MO-MDSCs. Weiterhin zeigten PMN-MDSCs immer einen titrierbaren Effekt. MO-MDSCs waren in ihrer inhibitorischen Potenz deutlich variabler. Dies war ein Effekt, der sich sehr oft gezeigt hat. Es gab auch ein Experiment, bei dem in geringem MO-MDSC– T-Zell Verhältnis die Proliferation über der Basisproliferation von stimulierten T-Zellen lag. Die Ursache dieses Effektes konnte letztlich nicht geklärt werden. Eine höhere Anfälligkeit der MO-MDSCs gegenüber äußeren Einflüssen, Kontamination mit Fremdzellen oder deren längere Aufreinigungszeit standen zur Diskussion. Dies könnte entweder eine T-Zell Proliferation zur Folge gehabt haben oder die MO-MDSCs bzw. die zugegebene Kontamination wiesen in diesen Experimenten eine hohe Eigenproliferation auf. In einem weiteren Experiment wurden MDSCs in einem FACS Sort gewonnen, um eine Kontamination ausschließen zu können (Daten nicht gezeigt). Hier zeigte sich ebenfalls eine entsprechende Inhibition. Die MO-MDSCs zeigen auch hier ein atypisches Verhalten, sodass zumindest in diesen Experiment eine Kontamination als Ursache praktisch ausgeschlossen werden konnte.

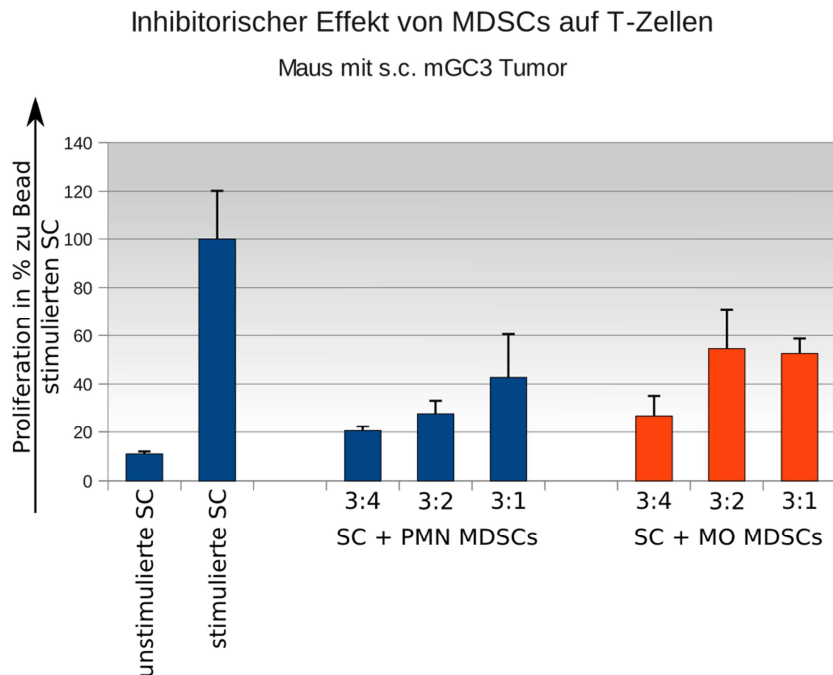


Abbildung 16: Inhibitorischer Effekt von MDSCs auf Splenozyten. Die Splenozyten stammten aus der Milz einer gesunden Spender-Maus. Die MDSCs aus der Milz einer mGC-3 Tumormaus

(Daten repräsentativ für drei Experimente)

4.1.2.2 Hemmung der IL-2-Produktion durch MDSCs

Bei den BrdU Experimenten wurden zudem IL-2 ELISAs durchgeführt um einen zweiten funktionellen Readout der T-Zellen zu erhalten. Vorteil eines IL-2 ELISA ist, dass dieser spezifischer für die T-Zellfunktion ist, als der BrdU-Proliferations-Assay. Bei einer Messung der Proliferation werden zwangsläufig alle sich teilenden Zellen erfasst. Damit sind Methoden zur Messung der Proliferation deutlich anfälliger gegenüber Kontaminationen. Zudem ist IL-2 ein Funktionsmarker der T-Zellen. Es zeigt sich also nicht nur die Expansion sondern auch die gesamte Aktivität der T-Zellen. Es wurde wie bei der Proliferationsmessung die Produktion von IL-2 mit verschiedenen Responderzellen verglichen. Einmal dienten als Responderzellen Splenozyten und einmal T-Zellen. In den IL-2 ELISA zeigte sich wie erwartet auch eine titrierbare Inhibition der IL2 Produktion durch die MDSC-Subpopulationen.

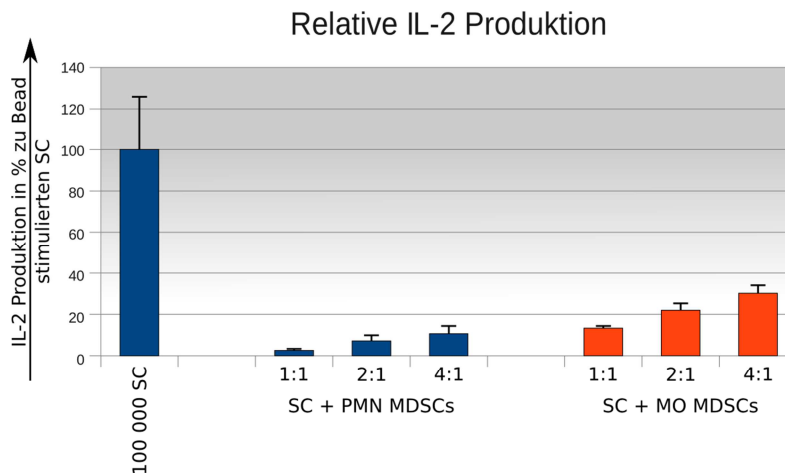


Abbildung 17: MDSC Vermittelte Inhibition der IL-2 Produktion der gesamt Splenozyten durch MDSCs im mGC-3 Modell

(Daten repräsentativ für drei Experimente)

Abbildung 17 zeigt ein äquivalentes Ergebnis wie die BrdU Experimente. Hier wurden als Zielzellen Splenozyten verwendet. Es zeigt sich neben der schon erwähnten Titrierbarkeit der Inhibition das durchweg beobachtete stärkere inhibitorische Potential der PMN-MDSCs im Vergleich zu den MO-MDSCs. Die Kokultivierung der MDSCs mit T-Zellen erbrachte ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 18). Auch hier überragte die Inhibition der PMN-MDSCs die der MO-MDSCs. Es zeigte sich zudem der bekannte Effekt, dass die Ergebnisse der MO-MDSCs des Öffern nicht gut titrierbar waren. Allerdings zeigte sich in beiden Experimenten eine gute Inhibition durch MO-MDSCs. Die Proliferation die mittels BrdU Aufnahme gemessen wurde zeigte also kongruentes Verhalten wie die über ELISA ermittelte IL-2 Produktion.

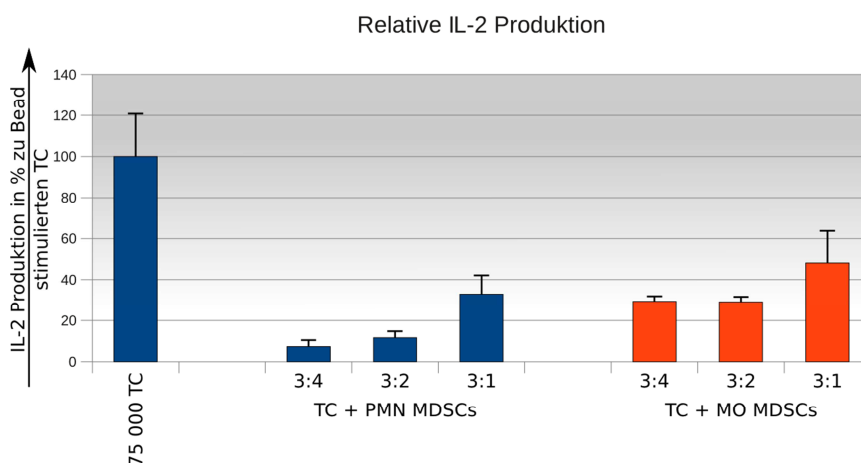


Abbildung 18: Inhibition der IL2 Produktion der T-Zellen durch MDSCs (mGC-3)

(Daten repräsentativ für drei Experimente)

4.2 Überleben der MDSCs in Zellkultur

Im vorangegangenen *in vitro* Modell konnte gezeigt werden, dass MDSCs die Proliferation sowie IL-2 Produktion von Responderzellen inhibieren. Weiter wurde in dieser Arbeit die Wirkung von CpG auf MDSCs untersucht. Die Frage, die sich stellte, war, ob die resultierenden Effekte auf eine direkte MDSC Stimulation durch CpG beruhten, oder ob ein anderer Zelltyp nach CpG Gabe die MDSCs z. B. über Zytokine modulierte. Diese Frage stellt einen zentralen Teil der vorgelegten Arbeit dar. Ein methodisches Problem stellte dabei die Tatsache dar, dass MDSCs ohne einen externen Stimulus relativ schnell absterben. Dies ist ein Faktor, der bei der Planung und Auswertung von Experimenten berücksichtigt werden sollte, dem jedoch in Publikationen über MDSCs zu wenig Beachtung geschenkt wird. In einem Experiment wurde deshalb zu Beginn dieser Arbeit getestet, inwieweit MDSCs ohne Stimulus bzw. mit einem CpG oder GM-CSF Stimulus überleben. GM-CSF wurde als Stimulanz gewählt, da für diesen Wachstumsfaktor bereits ein expansiver Effekt auf GR1+/CD11b+ Zellen beschrieben wurde (TALMADGE 2007). Hierfür wurden die MDSCs über MACS in zwei Schritten aufgereinigt (bis E1, siehe auch Abbildung 3). Entsprechend wurden nur PMN-MDSCs in diesem Versuchsdesign berücksichtigt. Die MDSCs wurden am Tag null in Duplikaten auf eine 96-Well Platte ausplattiert. Die einzelnen Zellfraktionen erhielten entweder CpG, GM-CSF oder gar keinen externen Stimulus. Die Zellen wurden am Tag eins und am Tag drei mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden sowohl die lebenden als auch die toten Zellen getrennt erfasst und der prozentuale Anteil der lebenden Zellen relativ zur Gesamtzellzahl bestimmt. Es zeigte sich in Abbildung 19, dass MDSCs alleine kaum lebensfähig sind. Nach nur einem Tag fiel der Anteil der lebenden Zellen auf unter 30%. CpG vermittelt dagegen einen gewissen Überlebensstimulus, wahrscheinlich über stimulierte verunreinigende Zellen, wie zum Beispiel B-Zellen. Dahingegen erhöhte die Gabe von GM-CSF die Überlebensrate auf fast 50% nach 24h. Der Langzeiteffekt war aber eher gering. Nach 72 Stunden betrug die Überlebensrate in allen Konditionen ca. 20%. Bei diesem Experiment muss zudem berücksichtigt werden, dass die Auszählung in der Zählkammer einen systematischen Bias enthielt, da tote Zellen nach einer gewissen Zeit zerfielen und nicht mehr mitgezählt werden konnten. Das heißt, die Überlebenszahlen sind etwas zu hoch geschätzt.

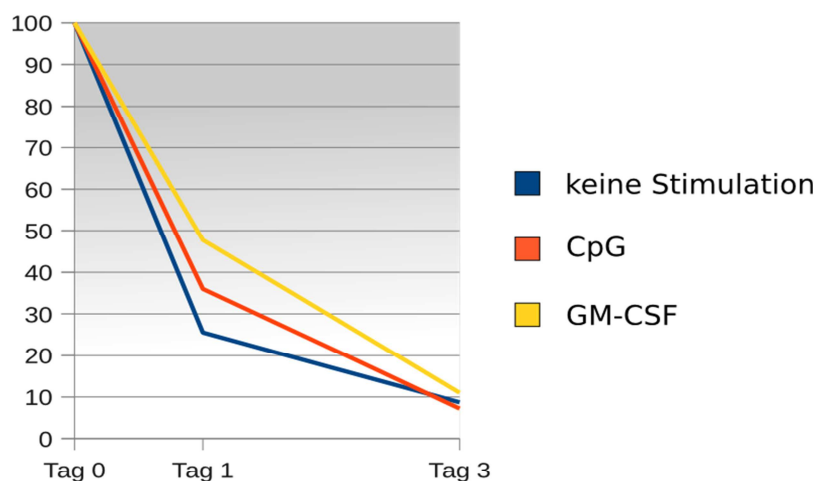


Abbildung 19: Überleben der MDSCs mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, wie sich MDSCs bezüglich des Überlebens *in vivo* verhalten. Splenozyten aus einer tumortragenden Maus ohne Aufreinigung mit CFSE gefärbt und anschließend in eine Empfängermaus transferiert. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellen in Zellkultur kultiviert. Dieses Verfahren bot den Vorteil, dass man eine interne Kontrolle und den direkten Vergleich zwischen *in vitro* und *in vivo* hatte. Des Weiteren entfiel der Zellstress durch die Aufreinigung. Diese markierten Zellen wurden danach mittels adoptivem Transfer in eine Empfängermaus überführt (3.2.1.4). Hier konnten im Gegensatz zur *in vitro* Kultur *in vivo* selektiv kaum noch MDSCs nachgewiesen werden.

Wenn man die sich die Organverteilung der transferierten MDSCs ansah, zeigt sich das die MDSCs nur in der Milz, und auch hier nur in einer geringen Anzahl nachweisbar waren. Zusammen mit der Tatsache, dass MDSCs relativ schnell in Apoptose gehen legt dies den Schluss nahe, dass man aufgrund des Blutmauser, die paar wenigen MDSCs die noch nachweisbar sind nur noch in der Milz finden kann. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass MDSCs sehr empfindlich sind und dass die transferierten MDSCs relativ schnell abgebaut werden. In Bedingungen, die mit CFSE gefärbt sind fiel eine deutlich höhere Apoptoserate der MDSCs auf.

Die niedrige Viabilität der MDSCs in Kultur und deutlich erniedrigte Viabilität unter Einfluss von CFSE zeigen, dass Experimente die eine lange Kulturzeit oder einen adoptiven Transfer beinhalten nur sehr schwer durchführbar sind. Gerade adoptive Transferexperimente sind nur schwer interpretierbar, da die hohe Apoptoserate der MDSCs nur begrenzte Aussagen zulässt und zu einem schnellen Abbau im Empfängerorganismus führt. Diese Experimente zeigten, dass MDSCs sowohl *in vitro* als auch bei adoptiven Transferexperimenten nur eine geringe Überlebenszeit aufwiesen. Diese konnte durch GM-CFS oder CpG Gabe *in vitro* langfristig nicht stabilisiert werden. Diese Tatsachen mussten bei Experimentplanungen berücksichtigt werden.

4.3 Funktioneller Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf MDSCs

Ein weiterer Teil der Arbeit befasst sich mit den direkten und indirekten Effekten von CpG-Oligonukleotiden als TLR-9-Agonist auf MDSCs. In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass MDSCs die aus CpG-behandelten Tumormäusen stammten weniger suppressiv waren als MDSCs aus unbehandelten Mäusen. In Kapitel 4.1.2 wurde bereits gezeigt, dass MDSCs in einer Kokultur mit T-Zellen sich stark suppressiv auf die Proliferation der T-Zellen auswirken. Im nächsten Schritt wurde der Effekt einer CpG Behandlung *in vitro* untersucht. Auch hier wurde die Proliferation mittels BrdU Assay ermittelt (3.2.4.2).

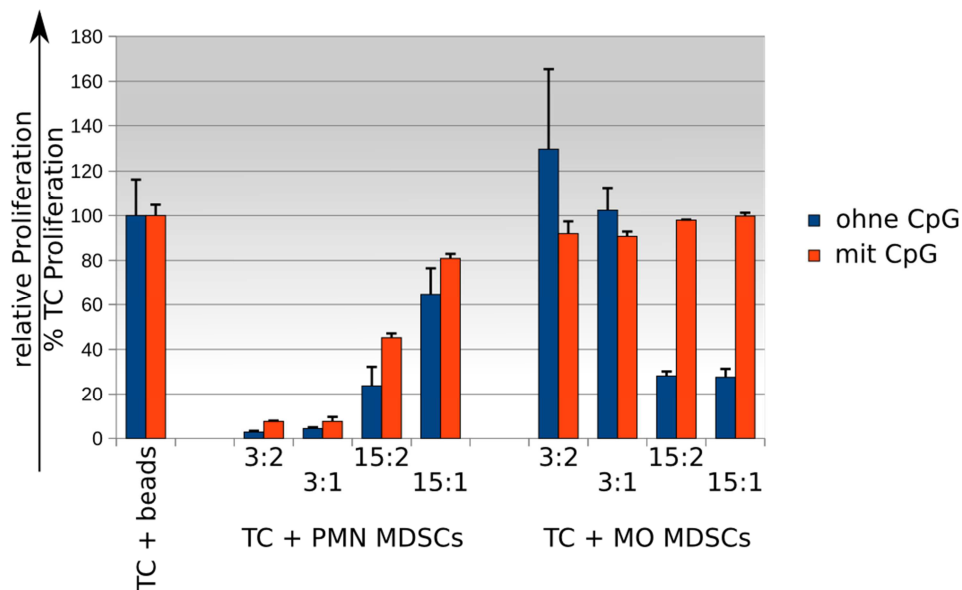


Abbildung 20: Direkter Effekt von CpG auf FACS gesortete MDSCs

(Daten aus einem Experiment)

Abgebildet ist die relative Proliferation. Als Bezugsgröße diente immer die Proliferation der jeweiligen MDSC freien Kondition. In den CpG freien Konditionen wurden als Bezugspopulation für die Proliferation die CD3/CD28 Bead stimulierten Zielzellen verwendet. Bei den CpG Konditionen wurde als Bezugsproliferation die Kondition gewählt, die zusätzlich zu den Beads mit CpG stimuliert war.

Abbildung 20 zeigt wiederum den inhibitorischen Effekt von FACS gesorteten MDSCs aus einer Milz, die aus einer *mGC-8* Tumormaus stammte. Die TC werden in ihrer Proliferation stark von den PMN-MDSCs inhibiert. Die Zugabe von CpG in einer Konzentration von 15µg/ml zeigte nur einen geringen Effekt auf die Proliferation. Die MO-MDSCs ergaben wie so oft ein uneinheitliches Bild, das nicht reproduzierbar war. In Abbildung 21 wird ein Experiment dargestellt, bei dem MDSCs mittels MACS aufgereinigt wurden und somit eine geringere Reinheit aufwiesen. Auch hier konnte

die Inhibition der MDSCs durch CpG nur teilweise aufgehoben werden. Wenn man das gleiche Experiment modifizierte, indem man Splenozyten statt T-Zellen verwendete, zeigte sich ein anderes Bild. Splenozyten wurden durch MDSCs ebenfalls in ihrer Proliferation gehemmt. Wenn allerdings CpG hinzugefügt wurde, expandierte diese Population deutlich. Splenozyten alleine reagierten auf CpG mit einem starken Anstieg der Proliferation. Dies ist vor allem auf eine schon bekannte B-Zell Proliferation unter CpG zurück zu führen (KLINMAN *ET AL.* 1996). In Anwesenheit von MDSCs zeigte sich der gleiche Effekt, zudem kam es zu keiner Inhibition mehr. Im Gegenteil: die Proliferation überstieg die Proliferation der Kondition von Splenozyten allein mit CpG, wie in Abbildung 22 zu sehen ist.

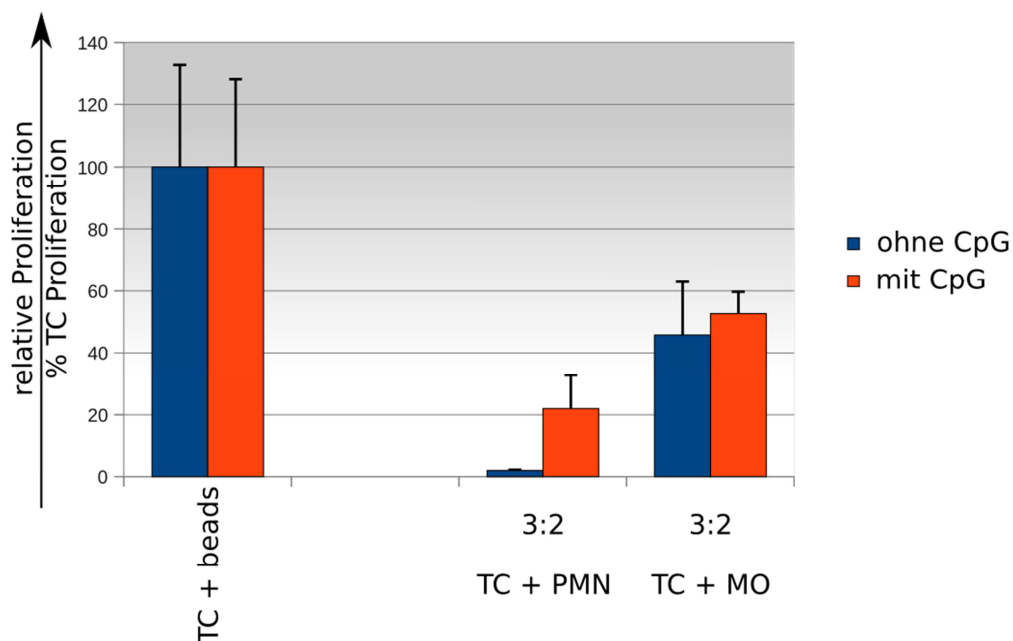


Abbildung 21: Einfluss von CpG auf MACS gesortete MDSCs

(Daten repräsentativ für mehr als drei Experimente)

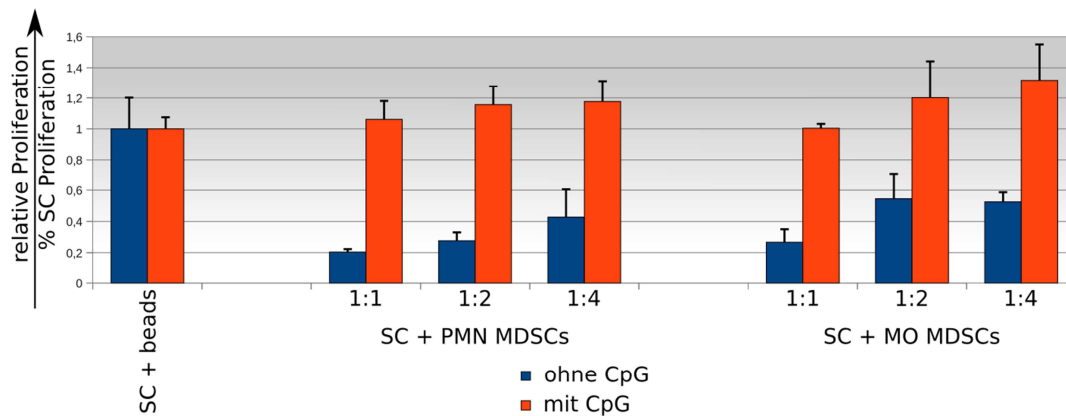


Abbildung 22: Einfluss von CpG auf die Proliferation der MDSCs in Kokultur mit Splenozyten ermittelt durch BrdU Assay

(Daten repräsentativ für mehr als drei Experimente)

Auch in dieser Abbildung ist wieder die relative Proliferation dargestellt. Auch MO-MDSCs Konditionen zeigen auf einen CpG Stimulus hin einen deutlichen Proliferationsanstieg. Dies zeigt, dass der inhibitorische Effekt von MDSCs durch CpG aufgehoben wird, sobald sie mit Splenozyten kokultiviert werden. Es zeigt sich sogar eine überproportionale Proliferation bei CpG Zugabe, die nicht allein mit der Eigenproliferation von CpG stimulierten MDSCs zu erklären ist. Da es nur in Anwesenheit von gesamt Splenozyten es zu einer kompletten Disinhibition kommt war die Frage ob es vielleicht eine „Vermittler“-Zelle für diesen Effekt gibt.

Die Frage war, welche Zelle diese „Vermittlerrolle“ einnimmt. Es ist bekannt, dass B-Zellen unter CpG Stimulus sehr stark proliferieren. T-Zellen und MDSCs dagegen zeigen allenfalls nur einen geringen oder gar keinen Effekt bei einem CpG Stimulus hinsichtlich ihrer Proliferation. Es wurde untersucht, ob von Splenozyten ein löslicher Faktor auf einen CpG Stimulus hin sezerniert wird, der ein Wachstum der TC-MDSC Fraktion bewirkt.

Für diesen Zweck wurden B-Zellen gesortet und zwei Stunden mit CpG stimuliert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und für weitere 12 Stunden kultiviert. Danach wurde der Zellanteil abzentrifugiert und das überstehende Medium als konditioniertes Medium gesammelt (Schema siehe Abbildung 23). In diesem Medium wurden nun T-Zellen mit PMN-MDSCs kokultiviert. Zum Vergleich wurden T-Zellen mit PMN-MDSCs in konditioniertem Medium kultiviert, das von B-Zellen stammt, die nicht mit CpG stimuliert wurden. Es wurde die Proliferation gemessen (Abbildung 24). Die Proliferationsrate änderte sich nicht signifikant.

Diese Experimente zeigten, dass die inhibitorischen Eigenschaften der MDSCs durch CpG zumindest zum Teil aufgehoben werden konnten. Weiter konnte gezeigt werden, dass es bei CpG Therapie in einer MDSC-Splenozyten Kondition zu einer Überproliferation kam. Die Hypothese, dass B-Zellen hier eine entscheidende Rolle für die Überproliferation spielen konnte zunächst nicht geklärt werden.

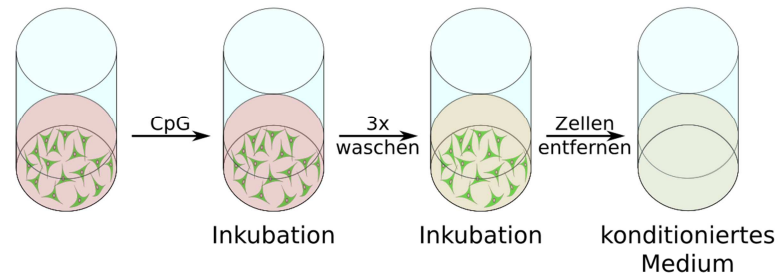


Abbildung 23: Prinzip der Gewinnung von konditioniertem Medium

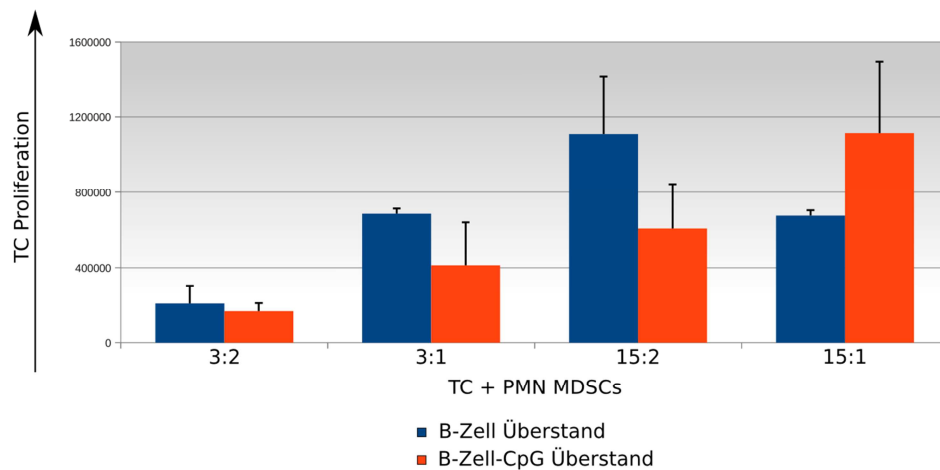


Abbildung 24: TC in Kokultur mit MDSCs in konditioniertem Medium

(Daten repräsentativ für zwei Experimente)

4.4 Reaktive Sauerstoffspezies in MDSCs

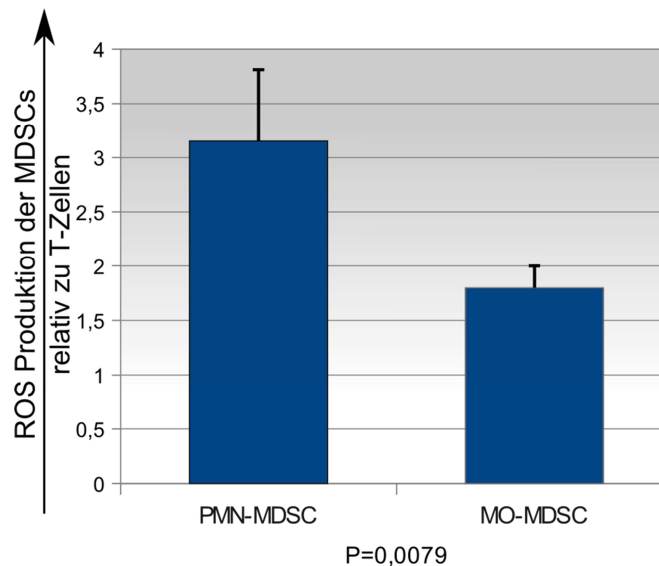


Abbildung 25: ROS-Produktion in den MDSC Subpopulationen im SV40 Modell

mittlerer MDSC-FACS-count: 13703

(n biologische Replikate = 5)

Es wurde schon in vorhergehenden Studien gezeigt, dass einer der Mechanismen, über den die MDSCs wahrscheinlich hemmend wirken, die Produktion von ROS (reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies) ist (YOUN *ET AL.* 2008). Im Rahmen der Versuche wurde die ROS-Produktion in den Subpopulationen der MDSCs im SV40 Modell untersucht. Zunächst wurde die Basisproduktion von PMN- und MO-MDSCs verglichen in fünf SV40-Mäusen. Es zeigte sich, dass PMN-MDSCs in Milzzellen eine signifikant höhere ROS-Produktion aufweisen als MO-MDSCs (Abbildung 25). Dies korreliert auch mit der bei uns nachgewiesenen stärkeren inhibitorischen Wirkung von PMN-MDSCs auf Splenozyten im BrdU-Assay. Des Weiteren wurde die ROS-Produktion der MDSCs in verschiedenen Geweben quantifiziert. Hier zeigte sich eine gewebespezifische Varianz, da sich sowohl die PMN- als auch die MO-MDSCs zwischen Peripherie (Tumor und Milz) und Knochenmark unterschieden. In der Milz ergab sich in beiden Subpopulationen der MDSCs eine signifikant höhere ROS-Produktion als im Knochenmark (jeweils $p < 0,01$). Die ROS-Produktion der MDSCs in der Tumorumgebung siedelte sich zwischen der Produktion in der Milz und im Knochenmark an. Der Unterschied zwischen Milz und Tumor war, da einige Tumoren zu wenig MDSCs Events hatten und deswegen nicht berücksichtigt werden konnten, statistisch nicht auswertbar (Abbildung 26). Es zeigte sich jedoch der Trend, dass MDSCs sich zwischen Knochenmark und Milz ansiedelten.

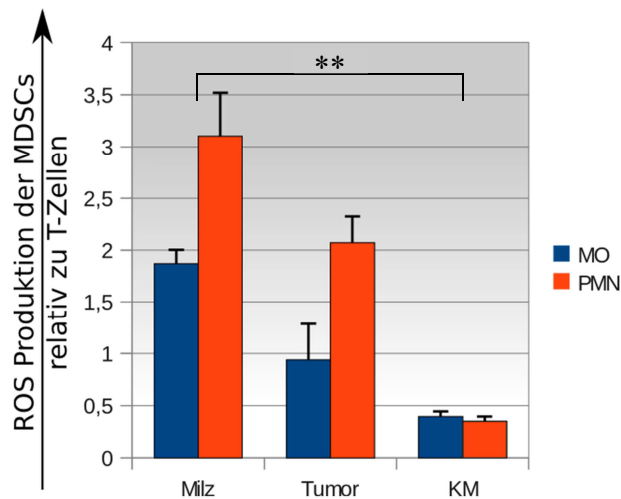


Abbildung 26: ROS Level in den verschiedenen Organen (** $p < 0,01$)

(Daten aus einem Experiment mit fünf biologischen Replikaten)

Auffällig ist ein Gefälle in der ROS-Produktion von „peripher“ nach zentral. Am geringsten ist sie im Knochenmark und steigt dann vom Tumor zur Milz an. Des Weiteren unterscheidet sich die ROS-Produktion zwischen den PMN- und MO-MDSCs im Knochenmark nicht, in der Peripherie trennen sich die Subpopulationen bezüglich ihrer Produktion auf.

Ein weiteres Augenmerk lag auf der Beeinflussbarkeit der ROS-Produktion durch *in vivo* bzw. *in vitro* Therapie mit CpG. Eine Veränderung der ROS-Produktion durch CpG könnte einen Wirkmechanismus der Disinhibition durch CpG zeigen. *In vivo* zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen therapierten und nicht therapierten Tieren. Es zeigte sich allenfalls eine Tendenz zur verminderten ROS Produktion. (Abbildung 27)

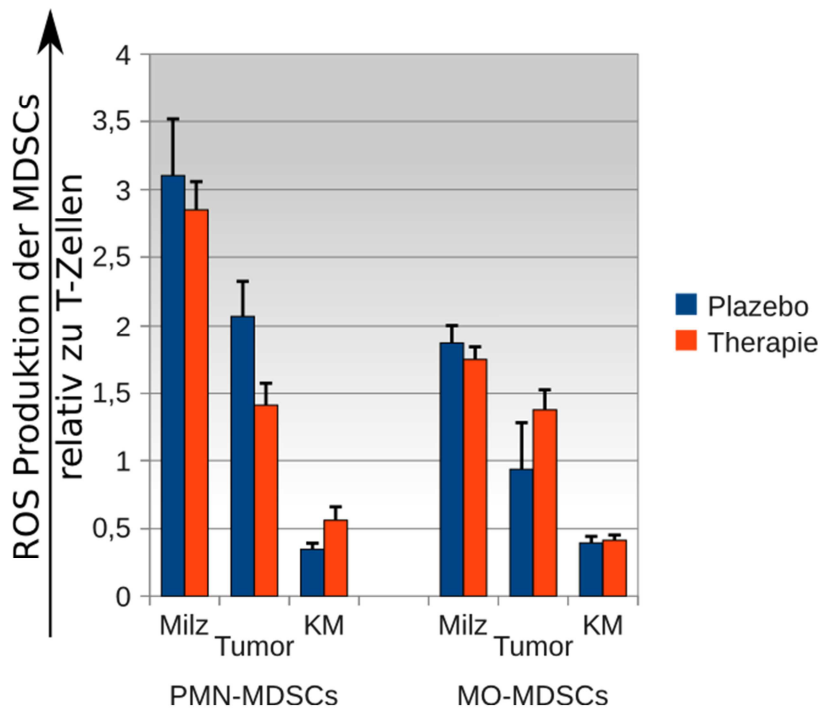


Abbildung 27: ROS Level mit und ohne *in vivo* Therapie mit CpG

mittlerer MDSC-FACS-count Placebo: Milz: 13756; Tumor:423; KM:24903

mittlerer MDSC-FACS-count Therapie: Milz: 10744; Tumor:367; KM:20828

(Daten aus einem Experiment)

Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei einer kurzzeitigen *in vitro* Therapie mit MDSC-haltigen Splenozyten. Hier wurden Splenozyten einer SV40 tumortragenden Maus nach der Organentnahme und Aufbereitung zur Einzelzellsuspension mit verschiedenen TLR-Liganden für 30 Minuten inkubiert. Es zeigte sich hier eine Tendenz zu einer ligandenabhängigen Depression der ROS-Produktion bei PMN-MDSCs (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte sich bei mehreren Liganden, bei CpG allerdings am wenigsten. Bei den MO-MDSCs zeigte sich wieder einmal ein uneinheitliches Bild. Die stärkste Reduktion zeigte sich bei beiden MDSC Subpopulationen bei R848 und p:IC. Es konnte also gezeigt werden, dass MDSCs sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ROS produzierten. Die stärkere und konstantere ROS Produktion der PMN-MDSCs korreliert mit den Beobachtungen der BrdU Wachstums Assays. Eine *in vitro* Kurzzeittherapie mit verschiedenen TLR-Agonisten führte zu einer verminderten ROS Produktion.

Diskussion

Expansion

Es wurde in dieser Arbeit zunächst gezeigt, dass die MDSCs im SV40 TAg Mäusen signifikant expandieren (Abbildung 12). In den korrespondierenden Tumormodellen zeigte sich im mGC-3 Modell ebenfalls ein signifikanter Anstieg der MDSCs-Population gegenüber dem Wildtyp. Es konnte zwar keine signifikante Expansion in dem *mGC-8* Modell gezeigt werden, aber auch zeigte sich Tendenziell ein Anstieg der MDSC-Population in der Tumorgruppe (Abbildung 11). In den korrespondierenden Tumormodellen zeigte sich zudem keine signifikante Veränderung des Verhältnisses der PMN- und MO-MDSCs im Vergleich zum tumorfreien Tier. Es deutete sich allenfalls eine Verschiebung in Richtung der PMN-MDSCs an. Der Vergleich im SV40 Tumormodell führte zu einem gleichen Ergebnis in den Subpopulationen (Abbildung 13). Seltene Abweichungen, wie zum Beispiel der Anstieg der MDSCs einzelner WT-Mäuse, konnten in der Regel auf anderweitige Erkrankungen in der WT-Gruppe zurückgeführt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden schon im Zusammenhang mit anderen Tumormodellen in aktuellen Studien veröffentlicht. Expansion von MDSCs in unterschiedlicher Ausprägung wurden bei Tumorerkrankungen sowohl im Menschen (ALMAND *ET AL.* 2001) als auch in verschiedenen anderen Tumormodellen bei Mäusen nachgewiesen (YOUN *ET AL.* 2008). Der prozentuale Anteil der MDSCs unterschied sich in den verschiedenen Tumormodellen. Dieser Effekt konnte in unserer Arbeitsgruppe anhand unterschiedlicher Tumormodelle (unter anderem EG7 und B16 Tumormodellen, Daten nicht gezeigt) nachvollzogen werden. Es zeigte sich durchgehend ein Anstieg der MDSC-Populationen im Tumorarm, auch wenn er unterschiedlich ausfiel und nicht immer signifikant waren. Die Ergebnisse dieser Arbeit warfen weitere Fragen zur Expansion auf, die aber nicht mehr bearbeitet werden konnten. Interessant wäre es vor allem, die zeitliche Dynamik der MDSC-Population und deren Unterpopulationen während der Tumorgenese, Wachstum und Oligonukleotid-Therapie in verschiedenen Tumormodellen weiter zu betrachten. Bei einigen Tumormodellen wurde dies für den Zeitraum des Tumorwachstums bereits untersucht (KUSMARTSEV *ET AL.* 2005), diese sollten aber noch mit weiteren Tumormodellen komplettiert werden. Untersuchungen zur Dynamik der MDSC-Populationen während und nach therapeutischen Interventionen stehen noch aus. Interessant wäre hier der Vergleich von konventioneller und chirurgischer Therapie. Derartige Untersuchungen von inhibitorischen Zellpopulationen während einer Therapie von entzündlichen Erkrankungen wären gerade im Hinblick als potentielle Prognosefaktoren interessant. Diese könnten eventuell der Labormedizin einen weiteren klinischen Überwachungsparameter an die Hand geben.

Suppression

Die inhibitorische Wirkung von MDSCs wurde erstmals in dieser Arbeit im korrespondierenden Tumormodell des SV40 Mausmodell *in vitro* untersucht. In bereits publizierten Studien wurden bereits andere Tumormodelle im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung der MDSCs untersucht. In der Studie von MOVAHEDI *ET AL.* (2008) konnte der titrierbare inhibitorische Effekt von MDSCs und deren Unterpopulationen im EG7-Modell bereits gezeigt werden. Das Ergebnis war auch in den dort untersuchten Tumormodellen eine (Unterpopulations-abhängige) titrierbare Suppression. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untergruppen experimentell getrennt untersucht. Es zeigte sich im Gegensatz zu der Arbeit von MOVAHEDI *ET AL.* (2008) dass die Untergruppe der PMN-MDSCs stärkere supprimierende Eigenschaften aufwies als die Gruppe der MO-MDSCs (Abbildung 15, Abbildung 16.), was sich sowohl in den Wachstums Assays, als auch in den IL-2 ELISA Experimenten nachweisen ließ (Abbildung 17, Abbildung 18). Während der experimentellen Phase fiel auf, dass MO-MDSCs des Öfteren schlechter titrierbare Ergebnisse ergaben als PMN-MDSCs (Abbildung 16). In einigen Fällen überstieg die Kondition, die MO-MDSCs beinhaltete, sogar die Basisproliferation der T-Zellen und war „invers titrierbar“. Ähnliche Effekte zeigten sich in der IL-2 Produktion. Die Ursache hierfür konnte letztendlich nicht geklärt werden, da es sich um einen nicht reproduzierbaren Effekt handelte. Als mögliche Ursachen wären allerdings eine Aktivierung der MO-MDSCs während des MACS-Sorts durch Ly6C Antikörper oder die Aktivierung anderer Ly6C positiver Zellen wie T- oder B-Zellen (DUMONT 1987, SCHLUETER *ET AL.* 2002) durch MACS Antikörper zu diskutieren. Um letzteres zu verhindern, war dem MACS allerdings ein Negativsort mit Anti - CD19 und Anti - CD3 vorgeschaltet. Eine Restkontamination durch T und B Zellen wäre denkbar, die dann durch eine Antikörperstimulation zu einer Überproliferation führen könnte. Möglich wäre hier, dass der MACS-Sorts, eine methodenabhängige Selektion von „robusteren“ MO-MDSCs verursacht. Dies würde auch bei der MACS-Aufreinigung eine gewisse Variabilität der Ergebnisse erklären, da jeder Sort nicht zu 100% reproduzierbar ist. Andererseits könnte die MO-Subpopulation eine deutlich variablere Gruppe von MDSCs darstellen, die je nach Immunzustand der Maus unterschiedliche Eigenschaften aufweist. Eine weitere Möglichkeit wäre die Aktivierung von TC bzw. BC in der Kokultur durch die Ablösung von FACS- bzw. MACS-Antikörpern, die an Ly6C binden, und sich anschließend an die zugegeben TC oder BC anlagern und diese aktivieren. Eine weitere Option wäre die direkte Aktivierung der MO-MDSCs mit einem disinhibitorischen Effekt über eine Antikörperbindung an Oberflächenmolekülen. Ein Hinweis dafür wäre der Vergleich mit der Studie von MOVAHEDI *ET AL.* (2008). Hier war die MO-MDSC-Subpopulation die Gruppe von Zellen die Responderzellen stärker inhibierten. Es handelt sich zum einem um ein anderes Tumormodell (EG7-Tumor). Allerdings wurden hier die MO-Fraktion anders

Aufgereinigt: die MO-MDSC Selektion erfolgte über einen CD11b und nicht über einen Ly6c bindenden Antikörper (hier Anti - Gr1). Weitere methodische Ansätze wären hier von Nöten, um diese Frage zu lösen. Möglich wäre zum Beispiel ein reiner Negativ-Sort der MO-MDSCs (mit CD3, CD5, B220, Ter119, Ly6G) um Antikörper- freie MDSCs zu gewinnen. Hier könnte ein Experiment, bei dem negativ gesortete MDSCs mit CD11b oder Gr1 Antikörpern inkubiert werden, klärende Ergebnisse liefern. Alles in allem müssen aus diesen Gründen die Ergebnisse der MO-MDSCs immer besonders kritisch betrachtet werden und überprüft werden.

Viabilität

Die größte experimentelle Herausforderung stellte die geringe Resistenz der MDSCs gegenüber Veränderungen der Umweltbedingungen dar. Wie in Abbildung 19 gezeigt, sterben MDSCs *in vitro* sehr schnell ab. Dass dieser Effekt nicht rein artifiziell ist, sondern auch *in vivo* eine Eigenschaft der MDSCs darstellt konnte wurde schon in in-vivo-Studien belegt. In der Studie von SAWANOBORI *ET AL.* (2008) konnte gezeigt werden, dass MDSCs einer sehr hohen Turnoverrate unterliegen. Dies muss bei der Planung von Experimenten und deren Auswertungen beachtet werden. Da isolierte MDSCs innerhalb von Tagen, wie in dieser Arbeit zu Beginn der experimentellen Phase gezeigt werden konnte, rasch apoptotisch werden, sind Experimente mit langfristiger Inkubation und an isolierten MDSCs kaum möglich. Um die Umweltbedingungen möglichst in-vivo nah zu halten, wurden die MDSCs wenn immer möglich in Kokultur mit anderen Zellen bzw. in konditioniertem Medium gehalten, um die Viabilität zu verbessern und keinen unnötigen artifiziellen Zellstress zu erzeugen. Des Weiteren wurden *in vitro* Experimente so kurz wie möglich gehalten, um dieses Problem zu minimieren. Auf eine generelle Zugabe von Wachstumsfaktoren, wie von einigen Autoren vorgeschlagen (YOUN *ET AL.* 2008), wurde verzichtet, da jeder externe Stimulus zu einer Differenzierung der MDSCs führt und die Ergebnisse artifiziell verändert. Eine Untersuchung der nativen MDSCs als solche, also den Status quo der MDSCs in der Maus *in vitro* beizubehalten ist, wenn überhaupt, nur über einen sehr kurzen Zeitraum möglich. Selbst die Rücktransferierung gesorteter MDSCs im Rahmen eines adoptiven Transfers scheiterte auf Grund des raschen Absterbens der MDSCs *in vivo*. Ursache hierfür könnte die hohe Turnoverrate der MDSCs sein, die durch die aufreinigungsbedingte Antikörpermarkierung und somit Demaskierung gegenüber dem Immunsystem aller Wahrscheinlichkeit nach noch erhöht wird. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass nicht aufgereinigte MDSCs, also der adoptive Transfer unbehandelter Milzzellen zu nachweisbaren MDSC Konzentrationen im Empfängertier führten . Einen weiteren Aspekt zeigte dieses Experiment: MDSCs waren im Verhältnis zu den adoptiv transferierten Splenozyten in geringerer Konzentration in der Milz der Empfängermaus vorhanden als in der parallel durchgeführten Zellkultur (Daten nicht gezeigt). Sie wurden also entweder schneller abgebaut oder

das Verteilungsverhalten der MDSCs unterschied sich von denen der Splenozyten. Im Zusammenhang mit dem in der Literatur dargestellten erhöhten Turnover könnten die Ergebnisse auch für eine schnellere Mauser der MDSCs sprechen, was bedeutet, dass die transferierten MDSCs schneller abgebaut werden als die transferierten Splenozyten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass MDSCs keine fixe Zellpopulation sind, sondern vielmehr ein Übergangsstadium darstellen. Eventuell entspricht die Expansion der MDSCs in Entzündungssituationen der Produktion von unreifen Erythrozyten-Vorläuferstufen bei starkem Blutverlust und stellt eine Folge einer verstärkten Stimulation des Knochenmarks im Rahmen einer Inflammation dar mit einer, bis dato nur *in vitro* nachgewiesenen, inhibitorisch regulatorischen Komponente. Die Ausschwemmung von unreifen Vorläuferstufen würde auch den hohen Turnover in der Maus und die hohe Empfindlichkeit erklären, da in der Peripherie (also nicht im Knochenmark) die adäquaten medullären Zytokine für Vorläuferzellen fehlen und die MDSCs deswegen dort rasch absterben würden. Ein weiteres Indiz dafür wäre, dass in der Peripherie die ROS-Produktion zunimmt. Der Farbstoff DCFDA wird nicht nur in Zellen umgesetzt, die eine spezifische ROS-Produktion als Abwehrmechanismus aufweisen, sondern auch in Zellen, die stressbedingt freie Radikale generieren. Diesen Effekt kann man zeigen, wenn man Zellen in eine nährstoffarme Umgebung überführt. Zellen, die unter derartigen Mangelbedingungen gehalten werden, weisen schon nach kurzer Zeit sehr hohe intrazelluläre ROS Level auf. Die hohen ROS Level in MDSCs der Milz (Abbildung 26) im Vergleich zu denen aus dem Knochenmark könnten zum Teil auf Stress durch fehlende Zytokine zurückzuführen sein. Auch konnte gezeigt werden, dass MDSCs im Blut neben einem niedrigeren ROS-Level auch geringere Topro-3 Level aufweisen. Dies stützt die Hypothese, dass der hohe ROS-Level in MDSCs z.T. auch apoptosebedingt sein könnte. Alles in allem wirft die Verletzlichkeit und geringe Lebenserwartung der MDSCs viele Fragen auf, ruft aber auch einige interessante Hypothesen hervor, die weiter geprüft werden sollten: Ist das Apoptoseverhalten der MDSCs ein Teil ihres Hemmmechanismus? Das Immunsystem könnte durch den Abbau „gebunden“ und dadurch eventuell indirekt gehemmt werden. Ähnliche Hypothesen lassen sich aus klinischen und tierexperimentellen Studien ableiten: Tumorpatienten oder Tumortiere bei denen intraoperativ Blutprodukte benötigt wurden bzw. denen Blut transfundiert wurde, haben ein etwas schlechteres Outcome (BLUMBERG *ET AL.* 1985, FRANCIS & SHENTON 1981), als Patienten die keine Transfusion erhielten. Inwieweit dies einen Bias darstellt oder eine Immunsuppression aufgrund der Zufuhr von Fremdanigenen darstellt (durch unmögliche Randomisierbarkeit und fehlende Standardisierung in der Blutproduktgabe) ist allerdings fraglich. Eine andere Frage ist, ob durch Beeinflussung der Apoptose die Funktion von MDSCs alterierbar ist? Dies könnte einen therapeutischen Ansatz darstellen. Oder es handelt sich nicht um Apoptose sondern eine sogenannte NETose. Ein denkbarer Mechanismus, da PMN MDSCs Vorläuferzellen von Neutrophilen darstellen können. Auch ließen sich hier eventuell Ansätze für die translationale

Forschung finden.

Ein anderer Ansatzpunkt wäre die Klärung, ob T-Zellen durch den MDSC Kontakt in eine Anergie eintreten, also gegenüber ihrem Zielantigen tolerant werden und die Milz inaktiviert verlassen. Ein indirekter Mechanismus der Anergie-Induktion durch die Induktion von Foxp3⁺ Tregs durch MDSCs wurde schon beschrieben (HUANG *ET AL.* 2006). Für weitere Untersuchungen sollten Methoden etabliert werden, bei denen externe Einflüsse minimiert werden. Ein erster Schritt wäre die Verwendung eines ausschließlich negativen Sort von MDSCs, der nach dieser Doktorarbeit in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Des Weiteren wären adoptive Transferexperimente mit MDSCs aus genetischen oder BrdU-markierten Mäusen vonnöten, um einen toxischen Einfluss von CFSE zu eliminieren. Dadurch könnte man eine recht gute *in vivo* nahe Organverteilung der MDSCs erzeugen, die frei vom Einfluss anhaftender Antikörper und toxischen Einflüssen von Farbstoffen wäre. Die Etablierung beider Methoden hätte allerdings den Rahmen der Dissertation gesprengt.

Funktioneller Effekt der MDSCs

Eine weitere Frage in der Dissertation war, ob CpG als Toll-Like-Rezeptor-9 Agonist die MDSCs in ihrer Supprimierbarkeit direkt beeinflusst. Da die verringerte Hemmung der MDSCs von *in vivo* mit CpG behandelten Mäusen experimentell in Vorarbeiten schon gezeigt wurde, galt es, diese Situation *in vitro* zu untersuchen, um die Disinhibition nachzuvollziehen und den Angriffspunkt dieser Therapie zu finden. In der Kokultur von PMN-MDSCs und T-Zellen konnte nur ein geringer Effekt von CpG auf die inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden (Abbildung 20, Abbildung 21). Dies zeigte sich sowohl bei MACS- als auch bei FACS-gesorteten MDSCs. In weiteren Experimenten, in denen MDSCs mit Splenozyten kokultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass CpG den inhibitorischen Effekt komplett aufheben konnte (Abbildung 22). Mehr noch, die Proliferation relativ zu der CpG-therapierten Splenozytengruppe wurde sogar übertroffen. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass CpG einen sehr starken Wachstumsstimulus in Splenozyten auslöst, der durch die MDSCs nicht mehr inhibiert werden konnte, oder dass MDSCs in ihrer inhibitorischen Wirkung geschwächt wurden. Diese Daten weisen zudem schon darauf hin, dass weder T-Zellen noch MDSCs die direkten Zielzellen für die CpG-Therapie waren. Die Kokultur mit T-Zellen wurde auch aus dem Grund veranlasst, da schon gezeigt wurde, dass TLR 9 nicht auf T-Zelllinien exprimiert wird (APPLEQUIST *ET AL.* 2002). Eine Aktivierung der TC durch CpG war deshalb wenig wahrscheinlich. Einer Aktivierung in dieser Kokultur wäre ein deutlicher Hinweis auf einen direkten CpG-Effekt auf MDSCs gewesen. Als Responderzellen der CpG Therapie wurden daraufhin B-Zellen und DCs untersucht, da diese auf eine CpG Stimulation bekanntermaßen sehr stark mit Zytokinproduktion reagieren (KRIEG 2002). Dafür wurde

konditioniertes Medium von CpG stimulierten Splenozyten gewonnen und mit diesem Medium anschließend MDSCs-T-Zell Kokulturen stimuliert. T-Zellen wurden als Kokulturzellen gewählt, da diese Konstellation auf eine etwaige CpG-Restkontaminierung am unempfindlichsten reagiert. Dies erfolgte auch, um den direkten von dem indirekten Stimulus abzugrenzen, bzw. einen direkten Einfluss zu verifizieren oder zu falsifizieren.

Die Zugabe von konditioniertem Medium aus CpG-stimulierten B-Zellen zeigte keinen einheitlichen Effekt (Abbildung 24). MO-MDSCs stellten auch hier wieder ein methodisches Problem dar, da dort kein stabiler Readout erlangt werden konnte. Eine Verbesserung der T-Zell Proliferation durch lösliche Faktoren, die von B-Zellen stammen zeigte sich hier jedoch nicht. Als Ursachen für die verminderte inhibitorische Wirkung von MDSCs standen mehrere denkbare Mechanismen zur Diskussion. Eine Möglichkeit wäre die Überstimulation von B-Zellen durch CpG. Eine weitere wäre neben der Alteration der Hemmmechanismen wie der ROS-Produktion, die Ausdifferenzierung der unreifen MDSCs in antigenpräsentierende Zellen gewesen.

Erste Experimente mit konditioniertem Medium von CpG stimulierten Splenozyten deuteten eine Differenzierung der MDSCs in Richtung dendritische Zellen an. Hier sind weitere Experimente von Nöten um dies zu untermauern.

Reactive Oxygen Species

Als weiterer funktioneller Faktor wurde ein Readout verwendet, der die Aktivität von reaktiven Sauerstoff Verbindungen (engl. **Reactive Oxygen Species** = ROS) in Zellen bestimmen konnte. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass sie nur kurze Inkubationszeiten benötigt und somit externe Einflüsse die Ergebnisse vergleichsweise wenig beeinflussen können. Lange Inkubationsphasen, die eine eventuelle Selektion über Apoptose hervorrufen oder in der die Zellen ungewollt differenzieren, entfallen. Aus diesem Grund wurde am Ende der experimentellen Phase auf diese relativ robuste Methode zurückgegriffen. Die Methode wurde nach CORZO *ET AL.* (2009) modifiziert. Es wurde bewusst nicht auf FCS verzichtet, da während der Etablierung der Methode in unserem Labor gezeigt wurde, dass die Abwesenheit von FCS und/oder Medium zu einem Zellstress führte, der bei allen Zellentypen höhere ROS-Werte hervorrief. Um die Methode von externen Einflüssen noch unabhängiger zu machen (Zellstress auf gesamte Zellpopulation), wurden die ROS-Level auf eine nicht ROS Produzierende Zellpopulation normalisiert, indem sie auf das T-Zell ROS-Level bezogen wurden. In den Experimenten zeigte sich, dass im SV40 Modell die PMN-MDSCs deutlich höhere ROS Level aufwiesen als MO-MDSCs (Abbildung 25). Dieses Ergebnis passt zu der Tatsache, dass PMN-MDSCs in den hier durchgeführten Experimenten im Allgemeinen stärker inhibitorisch auf das Wachstum wirkten, als MO-MDSCs. Dieser Unterschied der ROS-Produktion konnte allerdings nur in der Peripherie (Milz und Tumor MDSCs) nachgewiesen werden. Im Knochenmark zeigte sich kein Unterschied mehr zwischen den MDSC Subpopulationen

(Abbildung 26). Hier fielen die MDSCs zudem mit einer sehr geringen absoluten ROS-Produktion auf. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass MDSCs erst in der Peripherie aktiviert werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit würde allerdings auch eine Zellstress-Hypothese darstellen. Je länger MDSCs als unreife Zellen vom Knochenmarkmilieu getrennt sind, desto höher wird ihr Zellstress und somit ihre ROS-Level, da sie sich außerhalb vom Knochenmark womöglich in einer für sie nicht adäquaten Zytokin Umgebung aufhalten. Hierfür spricht auch, dass die Zugabe von GM-CSF das Überleben der MDSCs erhöhte (Abbildung 19).. Es ist notwendig, diese Frage in weiteren Experimenten zu klären. Möglich wäre dies eventuell durch Messung der ROS Level in Kokulturen mit konditioniertem Tumorzellmedium, sowie die Zugabe von Knochenmarkzytokinen. Zudem wäre es wichtig zu klären, in wieweit die Apoptoserate der MDSCs mit der ROS-Produktion korreliert.

Die Oligonukleotid-Therapie wurde auch in Hinblick auf die ROS-Produktion hin untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Es zeigten sich sowohl in der *in vivo* als auch in der *in vitro* Therapie mit CpG in der Milz bzw. bei Splenozyten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 27,). In der *in vivo* Therapie blieb der Unterschied zwischen Milz und Tumor bei den PMN-MDSCs bestehen. Bei MO-MDSCs kehrte sich das Verhältnis um (Abbildung 27). In der *in vitro* Therapie zeigte sich ein Rückgang der ROS-Produktion bei den PMN-MDSCs, bei den MO-MDSCs dahin gegen einen leichten Anstieg. Auch hier zeigten die MO-MDSCs wieder ein paradoxes Verhalten. Eine mögliche Ursache könnte in der geringeren absoluten ROS-Produktion der MO-MDSCs liegen, da hierdurch das Signal-Rausch-Verhältnis schlechter war.

Bei der Therapie mit anderen TLR-Liganden wie R848 oder p:IC zeigte sich *in vitro* eine Erniedrigung der ROS Level. Diese bieten weitere Anhaltspunkte für zukünftige Arbeiten, die den Effekt weiterer TLR-Liganden auf MDSCs untersuchen könnten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es zu einer gewissen Senkung der ROS-Level durch eine *in vitro* Therapie kommt. Dieses Verhalten ließ sich aber *in vivo* nicht signifikant abbilden. Dies könnte zum einem an der geringen Versuchstierzahl liegen oder an einem zu optimierenden CpG Therapieschema. Interessant ist auf alle Fälle die niedrige ROS-Produktion bei „jungen“ MDSCs im Knochenmark. Weitere Untersuchungen der ROS-Level sind nötig, wie die ROS-Produktion durch *in vitro* generierte MDSCs aus Knochenmark, oder das ROS-Verhalten „peripherer“ MDSCs in Kokultur in Knochenmark-Zellen sowie deren Korrelation mit Apoptose Markern. Des Weiteren wäre die Beschreibung der ROS-Level in unterschiedlichen Mausstämmen und Tumormodellen notwendig. Falls die ROS-Produktion von MDSCs einen relevanten Hemmmechanismus darstellt, wäre dies ein wichtiges Ergebnis, um die Gewichtung der einzelnen inhibitorischen Mechanismen

in unterschiedlichen Tumormodellen zu differenzieren. In einigen Tumormodellen wäre dies sicher ein interessanter pharmakologischer Ansatzpunkt. Ein unkonventionellerer Ansatz wäre hier die Gabe von Substanzen, die den Radikalabbau hemmen, durch die MDSCs im oxidativen Burst untergehen könnten. Anders herum könnten auch Radikalfänger helfen um die Inhibitorische Wirkung der MDSCs zu minimieren.

Zusammenfassung

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CpG-Oligonukleotide (CpG) als TLR9-Liganden einen antitumoralen Effekt besitzt. Des Weiteren konnte in einer vorangehenden Dissertation im C26-Tumormodell gezeigt werden, dass *myloid-derived suppressor cells* (MDSCs) nach *in vivo* Therapie mit CpG *ex vivo* weniger suppressiv waren. Zu klären blieb, in wie weit diesem Effekt eine Änderung des Phänotyps der MDSCs zugrunde lag.

Deswegen wurden im *in vitro* Modell die MDSCs unter dem Einfluss von CpG näher charakterisiert. Hierfür wurde zunächst die Expansion in SV40 TAg Mäusen und in den korrespondierenden Tumormodellen gezeigt. Weiterhin konnte der inhibitorische Effekt der MDSCs *in vitro* nachgewiesen werden. Die CpG-Therapie wurde daraufhin *in vitro* nachvollzogen und die Zielzellen der CpG-Wirkung identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Untergruppen der MDSCs unter CpG-Therapie den Differenzierungsblock zumindest zum Teil verlieren und den Weg in Richtung antigenpräsentierende Zelle einschlagen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Effekt von CpG auf MDSCs über einen dritten Zelltyp vermittelt wird. Je nach Unterpopulation waren die vermittelnden Zellen am ehesten dendritische Zellen oder B-Zellen. Da gezeigt werden konnte, dass MDSCs *ex vivo* eine labile Zellpopulation darstellten, wurden weitere Methoden zur funktionellen Charakterisierung der MDSCs geschaffen, die mit kurzen Inkubationszeiten auskamen. Hierfür wurde in der Arbeitsgruppe die ROS-Detektion mittels FACS-Analyse etabliert. Diese Methode zeigte im Vergleich der Literatur und zu den Vorarbeiten konsistente Ergebnisse. Die im Proliferationsassay stärker inhibierenden PMN-MDSCs zeigten gegenüber den MO-MDSCs höhere ROS-Levels. Des Weiteren konnte in den PMN-MDSCs auch mit nur kurzen Inkubationszeiten eine Verringerung der ROS-Produktion durch verschiedene TLR-Liganden wie R848 oder p:IC in Splenozyten nachgewiesen werden. CpG zeigte hier wenn überhaupt nur einen geringen Effekt.

Mit diesen Ergebnissen konnte die anfangs gestellte Frage beantwortet werden, wie MDSCs phänotypisch auf CpG reagieren. Weitere Studien sind notwendig, um die MDSCs weiter phänotypisch zu charakterisieren. Gerade die Frage, in wie weit andere TLR-Liganden den Phänotyp von MDSCs beeinflussen und ob es sich *in vivo* auch um direkte Liganden-Wirkungen handelt, bleibt offen. Dass andere Liganden wie R848 und p:IC einen Effekt auf MDSCs ausüben, konnten ROS-Experimente gezeigt. Diese Befunde können die Grundlage für die neue Strategien zur pharmakologischen Hemmung von MDSCs bilden.

5 Danksagung

Der Beginn gehört den Personen, denen ich diese Arbeit widme: meinen Eltern und hier insbesondere meiner Mutter. Ohne ihre Unterstützung wäre ein reibungsloses und erfolgreiches Medizinstudium wohl kaum oder nur unter bedeutend schwereren Bedingungen möglich gewesen. Auch haben sie mir mit ihrer vorausdenkender Planung eine finanziell sorgenfreie Ausbildung ermöglicht. Weiterhin haben sie mich gelehrt, die eigenen Werte zu hinterfragen und für diese einzustehen. Zudem haben sie immer wieder appelliert, Tatsachen und Begebenheiten kritisch zu betrachten und neu zu überdenken. Gerade in schweren Zeiten sind sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. In komplizierten Situationen haben sie mich mit ihrer Lebenserfahrung gestützt. Ich hoffe, dass ich ihnen zumindest im letzten Jahr meines Studiums ein wenig zurückgeben konnte. Weiterhin möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Christine Zoglmeier für die exzellente und kompetente Begleitung meiner Arbeit im Labor und während des Schreibens bedanken. Ich danke hier vor allem für die bedingungslose Unterstützung und die Freiheit, auch gewagtere Hypothesen zu diskutieren und zu prüfen. Hier habe ich viel über Methoden und über das Herangehen an molekularbiologische Fragestellungen gelernt. Sie hat zudem immer darauf geachtet, dass der rote Faden nicht verloren geht und hat mich durch die nicht immer ganz einfachen Gewässer der Forschung geführt. Auch möchte ich ihr für die Unterstützung bei Themen danken, die über die reine Laborarbeit hinausging. Sie war für mich eine sehr gute Mentorin, auf die ich nicht hätte verzichten können.

Natürlich sind hier auch meine Doktormutter Frau Prof. Carole Bourquin und der Abteilungsleiter Herr Prof. Stefan Endres zu nennen. Ohne ihre Unterstützung und Bereitstellung der Materialien wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Hier danke ich vor allem für die Integration in das Graduiertenkolleg 1202. Hier konnte ich den Kontakt zu anderen Arbeitsgruppen suchen, was einen sehr unkomplizierten Wissensaustausch gerade im Bereich der Methoden lieferte. Durch die finanzielle Unterstützung konnte ich mich ganz auf meine Laborarbeit konzentrieren.

Ein besonderer Dank gilt der technischen Assistentin Nadja Sandholzer. Sie war bei Projektplanung und Methoden immer eine kompetente Ansprechperson. Weiterhin danke ich für ihre Unterstützung gerade bei aufwändigeren Experimenten, die ohne sie nicht erfolgreich gewesen wären.

Als letztes möchte ich mich bei dem gesamten Team und den anderen Arbeitsgruppen der Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken, die eine sehr freundschaftliche und kreative Arbeitsumgebung geschaffen haben, die eine sehr gute Zusammenarbeit ermöglichte.

6 Veröffentlichungen

Originalarbeit

1. Zoglmeier C, Bauer, H, Nörenberg, D, **Wedekind, G**, Bittner, P, Sandholzer, N, Rapp, M, Anz, D, Endres, S & Bourquin, C (2011): CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research*, 17, 1765-75

Abstracts

1. Zoglmeier C, **Wedekind G**, Bittner P, Sandholzer N, Endres S and Bourquin C: "The impact of innate immune activation on the distribution and phenotype of MDSC subpopulations", Abstract at "Molecular Targets for Cancer Therapy: fifth biennial meeting" March 2009, Sheraton Sand Key Resort and Spa Clearwater Beach, Florida

2. Bittner P, Zoglmeier C, **Wedekind C**, Endres S, Bourquin C: "Modulating myeloid-derived suppressor cells by in-vivo CpG injection", Abstract at "Molecular Targets for Cancer Therapy: fifth biennial meeting" March 2009, Sheraton Sand Key Resort and Spa Clearwater Beach, Florida

3. **Wedekind G**, Zoglmeier C, Nörenberg D, Bittner P, Sandholzer N, Bourquin C, Endres S: "Modulating the suppressivity of myeloid - derived suppressor cells with activators of the innate immune system", Abstract at "3rd Tegernsee Conference on Immunotherapy of Cancer" July 2009, Residence Hotel Feldafing, Germany

4. Nörenberg D, **Wedekind G**, Wurzenberger C, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C, Zoglmeier C: "The impact of innate immune activation on the distribution and phenotype of myeloid-derived suppressor cell subpopulations", Abstract at "3rd Tegernsee Conference on Immunotherapy of Cancer" July 2009, Residence Hotel Feldafing, Germany

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Georg Wedekind
Geburtsdaten	23.06.1982, Tett nang
09/2011 – 03/2016	Assistenzarzt am Zentrum für Innere Medizin der Julius-Maximilians Universität Würzburg
seit 07/2016	Assistenzarzt am Zentrum I, Klinik am Eichert Göppingen

Studium

10/2003 – 03/2011	Studium an der Ludwig-Maximilian-Universität in München Studiengang Humanmedizin
04/2011	Abschluss: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1,8)
03/2006	Absolvierung des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (1,5)

Praktika

03/2010 – 07/2010	PJ Wahlfach Anästhesie am Klinikum Pasing
12/2009 – 03/2010	PJ Tertial Innere Medizin am Campus Innenstadt der LMU
8/2009 – 12/2009	PJ Tertial Chirurgische Medizin an der Klinik München Perlach
09/2008	Famulatur in der Chirurgischen Ambulanzpraxis Dr. Rieger
08/2008	Famulatur in der Allgemeinmedizin bei Dr. Szeöke
02-03/2008	Famulatur im Fach der Kardiologie am Rotkreuzklinikum München
10/2006	Famulatur in Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie am Klinikum Friedrichshafen

Schul Ausbildung

1996 – 2003	Finsterwalder Gymnasium Rosenheim
1995 – 1996	Droste Hülshoff Gymnasium Meersburg
1993 – 1995	Graf Soden Realschule
1988 – 1993	Grundschule Stephan-Brodmann Schule Immenstaad

7 Literaturverzeichnis

- ABOU FAKHER, F. H., RACHINEL, N., KLIMCZAK, M., LOUIS, J. & DOYEN, N. (2009): TLR9-dependent activation of dendritic cells by DNA from *Leishmania major* favors Th1 cell development and the resolution of lesions. *Journal of Immunology*, 182, 1386-96.
- ALMAND, B., CLARK, J. I., NIKITINA, E., VAN BEYNEN, J., ENGLISH, N. R., KNIGHT, S. C., CARBONE, D. P. & GABRILOVICH, D.I. (2001): Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of Immunology*, 166, 678-89.
- APPLEQUIST, S. E., WALLIN, R. P. A. & LJUNGGREN, H. (2002): Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *International Immunology*, 14, 1065-74.
- BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet*, 357, 539-45.
- BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D. A. & HORVATH, P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709-12.
- BICKLE, T. A. & KRÜGER, D.H. (1993): Biology of DNA restriction. *Microbiological Reviews*, 57, 434-50.
- BINGLE, L., LEWIS, C. E., CORKE, K. P., REED, M. W. R. & BROWN, N.J. (2006): Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British Journal of Cancer*, 94, 101-7.
- BLUMBERG, N., AGARWAL, M. M. & CHUANG, C. (1985): Relation between recurrence of cancer of the colon and blood transfusion. *British Medical Journal*, 290, 1037-9.
- BUNT, S. K., CLEMENTS, V. K., HANSON, E. M., SINHA, P. & OSTRAND-ROSENBERG, S. (2009): Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of Leukocyte Biology*, 85, 996-1004.
- CHUANG, T. & ULEVITCH, R.J. (2001): Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1518, 157-61.
- CLEM, I. W., DE BOUTAUD, F. & SIGEL, M.M. (1967): Phylogeny of immunoglobulin structure and function. II. Immunoglobulins of the nurse shark. *Journal of Immunology*, 99, 1226-35.
- COIFFIER, B., HAIOUN, C., KETTERER, N., ENGERT, A., TILLY, H., MA, D., JOHNSON, P., LISTER, A., FEURING-BUSKE, M., RADFORD, J. A., CAPDEVILLE, R., DIEHL, V. & REYES, F. (1998): Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*, 92, 1927-32.
- CORBETT, T. H., GRISWOLD, D. P. J., ROBERTS, B. J., PECKHAM, J. C. & SCHABEL, F.M.J. (1975): Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Research*, 35, 2434-9.
- CORZO, C. A., COTTER, M. J., CHENG, P., CHENG, F., KUSMARTSEV, S., SOTOMAYOR, E., PADHYA, T., MCCAFFREY, T. V., MCCAFFREY, J. C. & GABRILOVICH, D.I. (2009): Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology*, 182, 5693-701.
- DELANO, M. J., SCUMPIA, P. O., WEINSTEIN, J. S., COCO, D., NAGARAJ, S., KELLY-SCUMPIA, K. M., O'MALLEY, K. A., WYNN, J. L., ANTONENKO, S., AL-QURAN, S. Z., SWAN, R., CHUNG, C., ATKINSON, M. A., RAMPHAL, R., GABRILOVICH, D. I., REEVES, W. H., AYALA, A., PHILLIPS, J., LAFACE, D., HEYWORTH, P. G., CLARE-SALZLER, M. & MOLDAWER, L.L. (2007): MyD88-dependent expansion of

- an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of Experimental Medicine*, 204, 1463-74.
- DITTRICH, W. & GÖHDE, W. (1968): Automatisches Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion.. *Offenlegungsschrift 1815352, Aktenzeichen P 18 15 352.1*, 1-15.
- DU, X., POLTORAK, A., WEI, Y. & BEUTLER, B. (2000): Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *European Cytokine Network*, 11, 362-71.
- DUMONT, F. J. (1987): Stimulation of murine T cells via the Ly-6C antigen: lack of proliferative response in aberrant T cells from lpr/lpr and gld/gld mice despite high Ly-6C antigen expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 138, 4106-13.
- EKBOM, A., HELMICK, C., ZACK, M. & ADAMI, H.O. (1990): Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *The New England Journal of Medicine*, 323, 1228-33.
- FRANCIS, D. M. & SHENTON, B.K. (1981): Blood transfusion and tumour growth: evidence from laboratory animals. *Lancet*, 2, 871.
- HAGEMANN, T., ROBINSON, S. C., SCHULZ, M., TRÜMPER, L., BALKWILL, F. R. & BINDER, C. (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25, 1543-9.
- HAUSCHILD, A., WEICHENTHAL, M., BALDA, B., BECKER, J. C., WOLFF, H. H., TILGEN, W., SCHULTE, K., RING, J., SCHADENDORF, D., LISCHNER, S., BURG, G. & DUMMER, R. (2003): Prospective randomized trial of interferon alfa-2b and interleukin-2 as adjuvant treatment for resected intermediate- and high-risk primary melanoma without clinically detectable node metastasis. *Journal of Clinical Oncology*, 21, 2883-8.
- HORI, S., NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61.
- HUANG, B., PAN, P., LI, Q., SATO, A. I., LEVY, D. E., BROMBERG, J., DIVINO, C. M. & CHEN, S. (2006): Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research*, 66, 1123-31.
- INVITROGEN (2006): Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents. *MP 36103*,.
- KELLOGG, D. E., RYBALKIN, I., CHEN, S., MUKHAMEDOVA, N., VLASIK, T., SIEBERT, P. D. & CHENCHIK, A. (1994): TaqStart Antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques*, 16, 1134-7.
- KRIEG, A. M. (2002): CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 20, 709-60.
- KUSMARTSEV, S. & GABRILOVICH, D.I. (2003): Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *Journal of Leukocyte Biology*, 74, 186-96.
- KUSMARTSEV, S., NAGARAJ, S. & GABRILOVICH, D.I. (2005): Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *Journal of Immunology*, 175, 4583-92.
- LEEK, R. D., LEWIS, C. E., WHITEHOUSE, R., GREENALL, M., CLARKE, J. & HARRIS, A.L. (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research*, 56, 4625-9.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J.A. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-83.
- MAKARENKOVA, V. P., BANSAL, V., MATTA, B. M., PEREZ, L. A. & OCHOA, J.B. (2006): CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *Journal of Immunology*,

176, 2085-94.

MCHALE, L., TAN, X., KOEHL, P. & MICHELMORE, R.W. (2006): Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7, 212.

MENCACCI, A., MONTAGNOLI, C., BACCI, A., CENCI, E., PITZURRA, L., SPRECA, A., KOPF, M., SHARPE, A. H. & ROMANI, L. (2002): CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *Journal of Immunology*, 169, 3180-90.

MISHRA, B. B., GUNDRA, U. M. & TEALE, J.M. (2008): Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *Journal of Neuroinflammation*, 5, 53.

MORALES, A., EIDINGER, D. & BRUCE, A.W. (1976): Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *The Journal of Urology*, 116, 180-3.

MOVAHEDI, K., GUILLIAMS, M., VAN DEN BOSSCHE, J., VAN DEN BERGH, R., GYSEMANS, C., BESCHIN, A., DE BAETSELIER, P. & VAN GINDERACHTER, J.A. (2008): Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 111, 4233-44.

NÖCKEL, J., VAN DEN ENGEL, N. K., WINTER, H., HATZ, R. A., ZIMMERMANN, W. & KAMMERER, R. (2006): Characterization of gastric adenocarcinoma cell lines established from CEA424/SV40 T antigen-transgenic mice with or without a human CEA transgene. *BMC Cancer*, 6, 57.

OLDENBURG, M., KRÜGER, A., FERSTL, R., KAUFMANN, A., NEES, G., SIGMUND, A., BATHKE, B., LAUTERBACH, H., SUTER, M., DREHER, S., KOEDEL, U., AKIRA, S., KAWAI, T., BUER, J., WAGNER, H., BAUER, S., HOCHREIN, H. & KIRSCHNING, C.J. (2012): TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science*, 337, 1111-5.

OZINSKY, A., UNDERHILL, D. M., FONTENOT, J. D., HAJJAR, A. M., SMITH, K. D., WILSON, C. B., SCHROEDER, L. & ADEREM, A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 13766-71.

ROCK, F. L., HARDIMAN, G., TIMANS, J. C., KASTELEIN, R. A. & BAZAN, J.F. (1998): A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 588-93.

RUF, P., GIRES, O., JÄGER, M., FELLINGER, K., ATZ, J. & LINDHOFER, H. (2007): Characterisation of the new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *British Journal of Cancer*, 97, 315-21.

SAWANOBORI, Y., UEHA, S., KURACHI, M., SHIMAOKA, T., TALMADGE, J. E., ABE, J., SHONO, Y., KITABATAKE, M., KAKIMI, K., MUKAIDA, N. & MATSUSHIMA, K. (2008): Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*, 111, 5457-66.

SCHLUETER, A. J., KRIEG, A. M., DE VRIES, P. & LI, X. (2002): B cells express Ly-6C in a Th1 but not Th2 cytokine environment. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 99-806.

SCHNEIDER, J. J., UNHOLZER, A., SCHALLER, M., SCHÄFER-KORTING, M. & KORTING, H.C. (2005): Human defensins. *Journal of Molecular Medicine*, 83, 587-95.

SERAFINI, P., MGBROFF, S., NOONAN, K. & BORRELLO, I. (2008): Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Research*, 68, 5439-49.

SHI, Z., CAI, Z., SANCHEZ, A., ZHANG, T., WEN, S., WANG, J., YANG, J., FU, S. & ZHANG, D. (2011): A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 4517-24.

SMITH, L. C., CLOW, L. A. & TERWILLIGER, D.P. (2001): The ancestral complement system in sea

urchins. *Immunological Reviews*, 180, 16-34.

TALMADGE, J. E. (2007): Pathways mediating the expansion and immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and their relevance to cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 13, 5243-8.

THOMMA, B. P. H. J., CAMMUE, B. P. A. & THEVISSSEN, K. (2002): Plant defensins. *Planta*, 216, 193-202.

THOMPSON, J., EPTING, T., SCHWARZKOPF, G., SINGHOFEN, A., EADES-PERNER, A. M., VAN DER PUTTEN, H. & ZIMMERMANN, W. (2000): A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *International journal of cancer. Journal International du Cancer*, 86, 863-9.

UMEMURA, N., SAIO, M., SUWA, T., KITOH, Y., BAI, J., NONAKA, K., OUYANG, G., OKADA, M., BALAZS, M., ADANY, R., SHIBATA, T. & TAKAMI, T. (2008): Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 1136-44.

VIRCHOW, R. (1863-67): Die krankhaften Geschwülste. *Dreissig Vorlesungen. Verlag von August Hirschwald*.

VOISIN, M., BUZONI-GATEL, D., BOUT, D. & VELGE-ROUSSEL, F. (2004): Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 72, 5487-92.

YOUN, J., NAGARAJ, S., COLLAZO, M. & GABRILOVICH, D.I. (2008): Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*, 181, 5791-802.

ZHANG, D., ZHANG, G., HAYDEN, M. S., GREENBLATT, M. B., BUSSEY, C., FLAVELL, R. A. & GHOSH, S. (2004): A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303, 1522-6.

ZHU, C., LEE, V., FINN, A., SENGER, K., ZARRIN, A. A., DU PASQUIER, L. & HSU, E. (2012): Origin of Immunoglobulin Isotype Switching. *Current biology : CB*, 22, 872-880

ZOGLMEIER, C., BAUER, H., NÖRENBERG, D., WEDEKIND, G., BITTNER, P., SANDHOLZER, N., RAPP, M., ANZ, D., ENDRES, S. & BOURQUIN, C. (2011): CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research* 17, 1765-75.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Sämtliche Abbildungen beruhen auf einem eigenen Design und wurden selbst erstellt

Abbildung 1: Zellpiktogramme.....	8
Abbildung 2: Prinzip der MACS-Aufreinigung.....	27
Abbildung 3: Schema der MDSC-Aufreinigung (idealisiert).....	29
Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie.	34
Abbildung 5: Schema der DCFDA-Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies	37
Abbildung 6: Definition der MDSCs mittels FACS Gating	39
Abbildung 7: Strukturformel des Phosphat-Ribosederivat-Rückgrads der LNA	40
Abbildung 8: Prinzip des FRET und Aktivierung der LNA Sonden.....	41
Abbildung 9: CP Ermittlung anhand der Methode der 2. Ableitung.....	45
Abbildung 10: Prinzip des BrdU-Assay.....	47
Abbildung 11: Anteil der MDSCs im mGC-3 Tumormodell.....	49
Abbildung 12: Expansion der MDSCs in SV40 tumortragenden Mäusen	50
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Subpopulationen der MDSCs in SV 40 Mäusen	51
Abbildung 14: Aufbau der Inhibitionsversuche	52
Abbildung 15: Inhibitorischer Effekt von MDSCs auf T-Zellen im mGC-3 Modell	53
Abbildung 16: Inhibitorischer Effekt von MDSCs auf Splenozyten im mGC-3 Modell	54
Abbildung 17: Inhibition der IL-2 Produktion von Splenozyten durch MDSCs.....	55
Abbildung 18: Inhibition der IL2 Produktion von T-Zellen durch MDSCs	55
Abbildung 19: Überleben der MDSCs mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen	57
Abbildung 20: Direkter Effekt von CpG auf FACS gesortete MDSCs	58
Abbildung 21: Einfluss von CpG auf MACS gesortete MDSCs	59
Abbildung 22: Einfluss von CpG auf die Proliferation der MDSCs.....	60
Abbildung 23: Prinzip der Gewinnung von konditioniertem Medium	61
Abbildung 24: TC in Kokultur mit MDSCs in konditioniertem Medium	61
Abbildung 25: ROS-Produktion in den MDSC Subpopulationen im SV40 Modell	62
Abbildung 26: ROS Level in den verschiedenen Organen.....	63
Abbildung 27: ROS Level mit und ohne in vivo Therapie	64

Eidesstattliche Versicherung

Wedekind, Georg

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Immunaktivierung von myeloiden Suppressorzellen durch Toll-like-Rezeptor-Liganden wird über akzessorische Zellen vermittelt"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wendlingen, 23.06.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand